illumina®

Guida del sistema NextSeq® 500

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA
N. codice 15046563 Rev. I ITA
Maggio 2015

N. di catalogo SY-415-9001DOC

Personalizzare una breve guida al flusso di lavoro completo con Custom Protocol Selector
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEI PRODOTTI QUI DESCRITTI (COMPONENTI E SOFTWARE INCLUSI).

Cronologia revisioni

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15046563_ITA	I	Maggio 2015	Corretta la descrizione dei serbatoi riservati sulla cartuccia di reagenti.
15046563	H	Maggio 2015	Corretto il volume di Tween 20 nella soluzione di lavaggio utilizzata per i lavaggi manuali. Ristrutturate le informazioni relative alle opzioni di configurazione del sistema. Spostate le informazioni sul software Real-Time Analysis nell'Appendice A.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15046563	G	Febbraio 2015	Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.4. • Aggiunte le opzioni di lavaggio manuale: Quick Wash (Lavaggio rapido) e Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale). • Aggiunta la descrizione delle caratteristiche di personalizzazione della corsa per spurgare i materiali di consumo al termine della corsa e per saltare la conferma della verifica pre-corsa. • Aggiunta l'opzione per cancellare e riavviare una verifica pre-corsa. • Aggiunta l'opzione per permettere il monitoraggio della corsa in modalità indipendente. • Rimossa la descrizione dei file offset e dei file della determinazione delle fasi (phasing), che non sono più scritti nella cartella della corsa. • Aggiornata l'immagine del grafico di dispersione per mostrare le identificazioni delle basi distribuite in modo più uniforme quando si utilizza la versione 1.4 del software del sistema. • Aggiunta la descrizione di Run Copy Service (Esecuzione servizio copia). • Aggiunta l'opzione per utilizzare un primer Indice 2 personalizzato, possibile con NextSeq 500 Kit v2. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)*. Aggiornate le istruzioni per la preparazione dei reagenti per l'utilizzo di NextSeq 500 Kit v2: rimossi i passaggi manuali per caricare ipoclorito di sodio e i primer a doppia indicizzazione alla cartuccia di reagenti. Questi reagenti sono pre-caricati nella cartuccia di reagenti v2. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di riferimento per NextSeq 500/550 Kit v2 (n. codice 15058065)*. Aggiunta la sezione Materiali di consumo per il sequenziamento che elenca le versioni dei kit, versioni compatibili con NCS e il nome e il numero di codice della guida di riferimento del kit associata. Aggiornati i materiali di consumo forniti dall'utente per specificare l'utilizzo di NaOCl per le opzioni di lavaggio manuale introdotte in NCS v1.4. Corretti i requisiti per i cluster che attraversano il filtro a non più di una identificazione delle basi sotto il valore chastity nei primi 25 cicli. Aggiunto il volume di 120 ml di acqua da laboratorio alle istruzioni contenute in Verifica del sistema.
15046563_ITA	F	Settembre 2014	Corrette le descrizioni delle caratteristiche di NextSeq Control Software v1.3. Aggiornato l'URL per le schede di sicurezza (SDS) a support.illumina.com/sds.html. Aggiornato il marchio del prodotto NextSeq da ™ a ®.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15046563	E	Agosto 2014	Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.3: • Aggiornate le descrizioni dei comandi System Customization (Personalizzazione sistema) e Software Updates (Aggiornamenti software) sulla schermata Manage Instrument (Gestione strumento). • Aggiornata la descrizione della schermata Pre-Run Check (Verifica pre-corsa), che raggruppa gli elementi da verificare in quattro categorie allargabili. • Aggiornate le istruzioni di Live Help (Assistenza in diretta) per accedervi utilizzando l'URL. L'icona sulla schermata Home (Inizio) non è disponibile in NCS v1.3. • Aggiunta la procedura di reibridazione integrata sullo strumento per reibridare il primer Lettura 1. L'opzione per reibridare una cella a flusso è compatibile con NCS v1.3, o successiva, e richiede una nuova cartuccia di reagenti e una nuova cartuccia di tamponi. Aggiunta la *Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)* all'elenco delle risorse addizionali.
15046563	D	Giugno 2014	Aggiunte le istruzioni per caricare BP13 in posizione n. 18 della cartuccia di reagenti quando si eseguono corse a doppia indicizzazione. Corretto il ciclo al quale appaiono le metriche della densità cluster, che è il ciclo 25. Corrette le posizioni della cartuccia di reagenti per i primer personalizzati alla posizione n. 7 (Lettura 1), n. 8 (Lettura 2) e n. 9 (Indice 1). Aggiunta una nota relativa ai danni potenziali legati al riposizionamento dello strumento in seguito all'installazione. Rivolgersi sempre al rappresentante Illumina prima di riposizionare lo strumento. Aggiornato l'URL per le schede di sicurezza (SDS) a support.illumina.com/sds.ilmn.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15046563_ITA	C	Aprile 2014	Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.2 e RTA v2.1: • Aggiunto il nome della ricetta per NextSeq Mid da usare con NextSeq 500 Mid Output Kit. • Rimosse le istruzioni per l'aggiunta di NaOCl alla cartuccia dei tamponi di lavaggio per un lavaggio manuale. • Corretto il volume di NaOCl a 3 ml per la posizione n. 28 della cartuccia di reagenti, che è richiesta per un lavaggio post-corsa automatico. • Annotato che i nomi lunghi delle corse vengono visualizzati in un campo a scorrimento sulla schermata per l'impostazione della corsa. • Annotato che RTA v2 non applica le correzioni della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) alle letture indice. • Aggiunta la descrizione dei file di registro all'elenco dei file usati per la risoluzione dei problemi. • Aggiunte le istruzioni per svuotare un contenitore dei reagenti usati pieno durante una corsa. • Aggiunta la descrizione delle cartelle della ricetta, inclusa la posizione delle ricette personalizzate. • Aggiunta la descrizione delle verifiche termiche per ventole e sonde termiche.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15046563_ITA	B	Febbraio 2014	Aggiornate le descrizioni software a NextSeq Control Software v1.1: • Aggiunta la funzione di ricerca nella schermata Run Setup (Impostazione corsa) per filtrare l'elenco di corse disponibili. • Aggiunte le ricette disponibili incluse NextSeq High o NextSeq Mid, in base al tipo di cella a flusso. • Annotato che gli aggiornamenti software includono il contratto di licenza, note sulla versione e un elenco di software da aggiornare. • Aggiunta la descrizione del messaggio di errore RAID. • Annotato che un pulsante Exit (Esci) chiude NSS e riavvia automaticamente NCS al termine di una verifica del sistema. Aggiunta la durata di conservazione dei reagenti fino a un massimo di una settimana alla temperatura di 4 °C. Aggiornata l'etichetta della cartuccia di reagenti per il serbatoio n. 10 a Load Library Here (Caricare qui la libreria). Aggiornato l'elenco dei materiali di consumo forniti dall'utente per indicare ipoclorito di sodio al 3%-6% ed elencato un numero di catalogo del fornitore. Aggiornate le istruzioni per preparare una diluizione di NaOCl allo 0,06% per i lavaggi dello strumento, che include una riduzione in volume di 2 ml e una concentrazione di partenza di 3%-6%. Aggiunte le illustrazioni per mostrare la posizione corretta ed errata delle clip sulla cella a flusso. Aggiornato il capitolo Real-Time Analysis (RTA) per includere una panoramica di RTA v2, la struttura della cartella di output e il processo di identificazione delle basi. Aggiornato il capitolo sulla risoluzione dei problemi per includere gli errori di RTA v2 e includere RunParameters.xml nell'elenco dei file di risoluzione dei problemi.
15046563	A	Gennaio 2014	Versione iniziale.

Sommario

Informazioni preliminari

Introduzione

Il sistema NextSeq® 500 Illumina® unisce la potenza del sequenziamento a elevata processività con la semplicità di un sequenziatore da banco.

Caratteristiche del sequenziamento

- **Sequenziamento ad elevata processività**: NextSeq 500 permette il sequenziamento degli esomi, degli interi genomi e dei trascrittomi e supporta le librerie TruSeq® e Nextera®.
- **Tipi di celle a flusso**: le celle a flusso sono disponibili in configurazioni ad output elevato e ad output medio. Ciascun tipo di cella a flusso è confezionata con una cartuccia di reagenti pre-riempita compatibile.
- **Real-Time Analysis (RTA)**: software di analisi integrato che esegue l'analisi dei dati sullo strumento, che comprende l'analisi delle immagini e l'identificazioni delle basi. NextSeq utilizza una nuova implementazione di RTA chiamata RTA v2, che comprende importanti differenze dal punto di vista dell'architettura e delle caratteristiche. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 59.
- **Integrazione BaseSpace®** : il flusso di lavoro di sequenziamento è integrato con BaseSpace, l'ambiente di calcolo genomico Illumina per l'analisi dei dati, l'archiviazione e la collaborazione. Per gli strumenti configurati per BaseSpace, le informazioni sulle librerie e i parametri della corsa sono specificati nella scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace. Le corse che sono state impostate in BaseSpace vengono visualizzate sull'interfaccia dello strumento durante l'impostazione della corsa. Mentre la corsa è in fase di elaborazione, i file di output sono trasmessi in tempo reale a BaseSpace o a BaseSpace Onsite.

Considerazioni sulla sicurezza

Per informazioni importanti sugli aspetti relativi alla sicurezza, vedere la *Guida sulla sicurezza e conformità del sistema NextSeq (n. codice 15046564_ITA)*.

Risorse addizionali

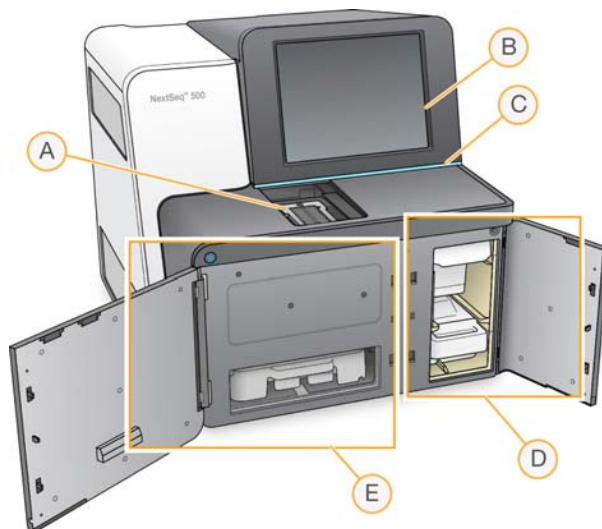
È possibile scaricare la documentazione seguente dal sito Web Illumina.

Risorsa	Descrizione
Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema NextSeq (n. codice 15045113_ ITA)	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
Guida sulla sicurezza e conformità del sistema NextSeq (n. codice 15046564_ITA)	Fornisce informazioni relative agli aspetti di sicurezza del funzionamento, alle dichiarazioni di conformità e alle etichette dello strumento.
Guida per l'utente del lettore RFID - modello n. TR-001-44 (n. codice 15041950_ITA)	Fornisce informazioni sul lettore RFID nello strumento, certificazioni di conformità e considerazioni relative alla sicurezza.
Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (n. codice 15048776)	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie preparate per una corsa di sequenziamento e per preparare un campione di controllo PhiX facoltativo. Questa procedura si applica alla maggior parte dei tipi di librerie.
Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)	Fornisce informazioni relative all'uso di primer di sequenziamento personalizzati al posto di primer di sequenziamento Illumina.
Guida di BaseSpace (help.basespace.illumina.com)	Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace® e sulle opzioni di analisi disponibili.

Consultare la pagina di supporto per NextSeq 500 sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, alla formazione online e alle domande frequenti (FAQ).

Componenti dello strumento

Il sistema NextSeq 500 comprende un monitor touch screen, una barra di stato e tre scomparti.

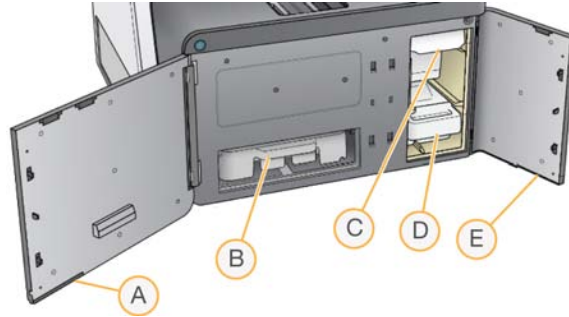
Figura 1 Componenti dello strumento

A **Scomparto di imaging**: contiene la cella a flusso durante una corsa di sequenziamento.
B **Monitor touch screen**: permette la configurazione e l'impostazione integrate sullo strumento utilizzando l'interfaccia del software di controllo.
C **Barra di stato**: indica lo stato dello strumento come in elaborazione (blu), richiede attenzione (arancione) e pronto per il sequenziamento (verde) o quando è necessario eseguire un lavaggio entro 24 ore (giallo).
D **Scomparto tamponi**: contiene la cartuccia di tamponi e il contenitore dei reagenti usati.
E **Scomparto reagenti**: contiene la cartuccia di reagenti.

Scomparto di imaging

Lo scomparto di imaging alloggia il piano che comprende tre perni di allineamento per posizionare la cella a flusso. Dopo aver caricato la cella a flusso, lo sportello dello scomparto di imaging si chiude automaticamente e sposta i componenti in posizione.

Scomparto reagenti e scomparto tamponi

L'impostazione di una corsa di sequenziamento su NextSeq 500 richiede l'accesso allo scomparto reagenti e allo scomparto tamponi per caricare i materiali di consumo della corsa e per svuotare il contenitore dei reagenti usati.

Figura 2 Scomparto reagenti e scomparto tamponi

A **Sportello dello scomparto reagenti**: chiude lo scomparto reagenti con un dispositivo di blocco che si trova sotto l'angolo inferiore destro dello sportello. Lo scomparto reagenti alloggia la cartuccia di reagenti. I reagenti vengono pompati nei pescanti, scorrono nel sistema di fluidica e infine giungono alla cella a flusso.

B **Cartuccia di reagenti**: la cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso pre-riempito.

C **Cartuccia di reagenti**: la cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso pre-riempito.

D **Contenitore dei reagenti usati**: i reagenti usati sono raccolti per lo smaltimento dopo ciascuna corsa.

E **Sportello dello scomparto tamponi**: chiude lo scomparto tamponi con un dispositivo di blocco che si trova sotto l'angolo inferiore sinistro dello sportello. Lo scomparto tamponi contiene la cartuccia di tamponi e il contenitore dei reagenti usati.

Panoramica sui materiali di consumo per il sequenziamento

L'esecuzione di una corsa di sequenziamento su NextSeq 500 richiede un NextSeq 500 Kit monouso. Ciascun kit include una cella a flusso e i reagenti richiesti per eseguire una corsa di sequenziamento.

I componenti del kit sono etichettati con indicatori codificati per colore per indicare la compatibilità tra le celle a flusso e le cartucce di reagenti. Utilizzare sempre una cartuccia di reagenti e una cella a flusso compatibili. La cartuccia di tamponi è universale.

La cella a flusso, la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi utilizzano l'identificazione a radiofrequenza (RFID) per la compatibilità e il monitoraggio accurato dei materiali di consumo.

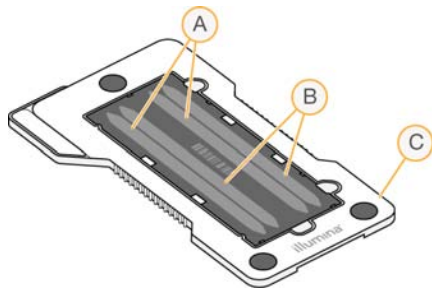
Etichettatura per la compatibilità dei kit

I componenti del kit sono etichettati con indicatori codificati per colore per indicare la compatibilità tra le celle a flusso e le cartucce di reagenti. Utilizzare sempre una cartuccia di reagenti e una cella a flusso compatibili. La cartuccia di tamponi è universale.

Ciascuna cella a flusso e cartuccia di reagenti è etichettata **High** (Elevato) o **Mid** (Medio). Verificare sempre l'etichetta quando si preparano i materiali di consumo per una corsa.

Tipo di kit	Marchio sull'etichetta
Componenti di High Output Kit	HIGH
Componenti di Mid Output Kit	MID

Panoramica sulla cella a flusso

Figura 3 Cartuccia della cella a flusso

A Coppia corsie A - corsie 1 e 3
B Coppia corsie B - corsie 2 e 4
C Struttura della cartuccia della cella a flusso

La cella a flusso è un substrato su vetro su cui vengono generati i cluster e viene eseguita la reazione di sequenziamento. La cella a flusso è racchiusa in una cartuccia della cella a flusso.

La cella a flusso contiene quattro corsie che sono sottoposte a imaging in coppie.

- Le corsie 1 e 3 (coppia corsie A) sono sottoposte a imaging contemporaneamente.
- Le corsie 2 e 4 (coppia corsie B) sono sottoposte a imaging al completamento dell'imaging della coppia di corsie A.

Sebbene la cella a flusso disponga di quattro corsie, solo una singola libreria o un set di librerie sottoposte a pooling viene sequenziato sulla cella a flusso. Le librerie vengono caricate sulla cartuccia di reagenti da un singolo flacone e trasferite automaticamente alla cella a flusso a tutte e quattro le corsie.

Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in aree denominate tile. Per maggiori informazioni, vedere *Tile della cella a flusso* a pagina 68.

Panoramica sulla cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti è un materiale di consumo monouso dotato di etichetta RFID e serbatoi con sigillo in alluminio che sono preriempiti con i reagenti di sequenziamento e i reagenti per la generazione di cluster.

Figura 4 Cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti comprende un serbatoio designato al caricamento delle librerie preparate. Dopo l'avvio della corsa, le librerie vengono trasferite automaticamente dal serbatoio alla cella a flusso.

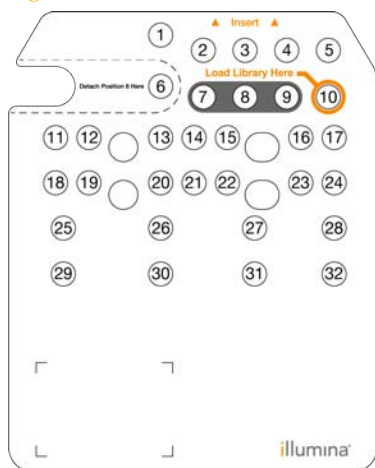
Diversi serbatoi sono riservati per il lavaggio automatico post-corsa. La soluzione di lavaggio viene pompata dalla cartuccia di tamponi ai serbatoi riservati attraverso il sistema e quindi al contenitore dei reagenti usati.

Ciascun serbatoio sulla cartuccia di reagenti è numerato. Non perforare i sigilli in alluminio a meno che non sia richiesto, ad esempio, per caricare le librerie prima di una corsa.

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Serbatoi riservati

Figura 5 Serbatoi numerati

Posizione	Descrizione
7, 8 e 9	Riservate per i primer personalizzati facoltativi
10	**Caricamento delle librerie**

Per informazioni sui primer personalizzati, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456).*

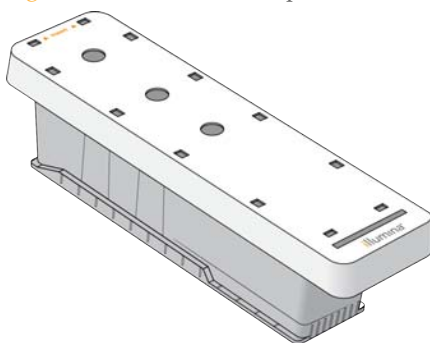
Serbatoio rimovibile in posizione n. 6

La cartuccia di reagenti pre-riempita include un reagente di denaturazione nella posizione n. 6 che contiene formammide. Per semplificare lo smaltimento sicuro di qualsiasi reagente non usato dopo una corsa di sequenziamento, il serbatoio in posizione 6 è rimovibile.

Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6* a pagina 31.

Panoramica sulla cartuccia di tamponi

La cartuccia di tamponi è un materiale di consumo monouso che contiene tre serbatoi preriempiti con tampone e soluzione di lavaggio. Il contenuto della cartuccia di tamponi è sufficiente per il sequenziamento di una cella a flusso.

Figura 6 Cartuccia di tamponi

Avvio dello strumento

1 Portare l'interruttore di alimentazione in posizione **I** (acceso).

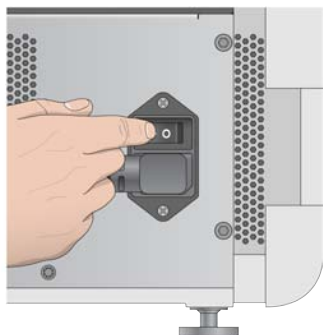
Figura 7 Interruttore di alimentazione sulla parte posteriore dello strumento

2 Premere il pulsante di alimentazione sopra lo scomparto reagenti. Il pulsante di alimentazione accende l'alimentazione dello strumento e avvia il computer e il software dello strumento integrati.

Figura 8 Pulsante di alimentazione sulla parte anteriore dello strumento

3 Attendere che il sistema operativo completi il caricamento.
Quando il sistema è pronto, NextSeq Control Software (NCS) si avvia ed esegue automaticamente l'inizializzazione del sistema. Al termine dell'inizializzazione si apre la schermata di Home (Inizio).
Se il sistema è stato configurato per l'accesso mediante credenziali, eseguire il login con il nome utente e la password predefiniti:
- Nome utente: **sbsuser**
- Password: **sbs123**
In caso contrario, eseguire il login utilizzando le credenziali specificate per la sede.

Pulsante di accensione

Il pulsante di accensione si trova nella parte anteriore di NextSeq e permette di accendere lo strumento e il computer dello strumento. Il pulsante di accensione esegue le azioni seguenti in base allo stato di accensione dello strumento.

Stato di accensione	Intervento
Lo strumento è spento	Premere brevemente il pulsante per accendere l'alimentazione.
Lo strumento è acceso	Premere brevemente il pulsante per spegnere l'alimentazione. Sullo schermo viene visualizzata una finestra di dialogo per confermare uno spegnimento normale dello strumento.
Lo strumento è acceso	Premere e tenere premuto il pulsante di accensione per 10 secondi per forzare lo spegnimento dello strumento e del computer dello strumento. Utilizzare questo metodo per spegnere lo strumento solo se lo strumento non risponde.

NOTA
Spegnere lo strumento durante una corsa di sequenziamento termina la corsa immediatamente. La terminazione di una corsa è definitiva. I materiali di consumo della corsa non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento ottenuti dalla corsa non sono salvati.

Software NextSeq

Il software dello strumento include applicazioni integrate che eseguono le corse di sequenziamento.

- **NextSeq Control Software (NCS)**: il software di controllo guida l'utente lungo l'intera procedura per l'impostazione di una corsa di sequenziamento.
- **Software Real-Time Analysis (RTA)**: RTA esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi durante la corsa di sequenziamento. NextSeq 500 utilizza RTA v2, che include differenze importanti nell'architettura e nelle caratteristiche rispetto alle versioni precedenti. Per maggiori informazioni, vedere *Real-Time Analysis (RTA)* a pagina 59.

Schermata Home (Inizio)

L'interfaccia di NextSeq Control Software (NCS) apre la schermata Home (Inizio).

Figura 9 Schermata Home (Inizio)

- **Sequence** (Sequenziamento): apre una serie di schermate che guidano l'utente nella procedura di impostazione di una corsa di sequenziamento.
- **Manage Instrument** (Gestione strumento): fornisce le opzioni per configurare le impostazioni del sistema, eseguire una verifica del sistema, aggiornare il software e spegnere lo strumento. Vedere *Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)* a pagina 13.

  Se lo strumento è connesso a una rete con accesso a Internet, quando è disponibile un'aggiornamento software viene visualizzata un'icona di segnalazione.
- **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio): fornisce le opzioni per un lavaggio dello strumento manuale. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale* a pagina 39.

  Quando è richiesto un lavaggio, viene visualizzata un'icona di segnalazione sul pulsante Perform Wash (Esecuzione lavaggio).

Schermate per l'impostazione della corsa

Selezionando **Sequence** (Sequenziamento) sulla schermata Home (Inizio) si apre una serie di schermate che guidano l'utente nella procedura di impostazione della corsa di sequenziamento. Il flusso di lavoro standard include le fasi di accesso a BaseSpace, caricamento dei materiali di consumo per la corsa, revisione dei parametri della corsa, esecuzione di una verifica automatica pre-corsa del sistema e quindi l'avvio della corsa. Per maggiori informazioni vedere *Sequenziamento* a pagina 21.

Opzione avanzata di caricamento

Il flusso di lavoro standard per l'impostazione della corsa di sequenziamento passa attraverso una serie di schermate per caricare i materiali di consumo della corsa. L'opzione avanzata di caricamento unisce su una sola schermata le fasi di caricamento di cella a flusso, cartuccia di buffer e cartuccia di reagenti e di svuotamento del contenitore dei reagenti usati.

Caricare i materiali di consumo per la corsa e il contenitore dei reagenti usati vuoto in qualsiasi ordine. Una volta terminato, selezionare **Load** (Carica) per spostare la cella a flusso e la cartuccia di reagenti in posizione. Il posizionamento automatico dei materiali di consumo può richiedere fino a 30 secondi. Quando i componenti della corsa sono in posizione, selezionare **Next** (Avanti).

Per attivare l'opzione avanzata di caricamento, selezionare **Use Advanced Load Consumables** (Usa caricamento avanzato dei materiali di consumo) sulla schermata Run Customization (Personalizzazione corsa). Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 16.

Icone di stato

Nell'angolo superiore destro di ciascuna schermata è visualizzata un'icona di stato che segnala eventuali cambiamenti delle condizioni operative durante l'impostazione o l'esecuzione della corsa.

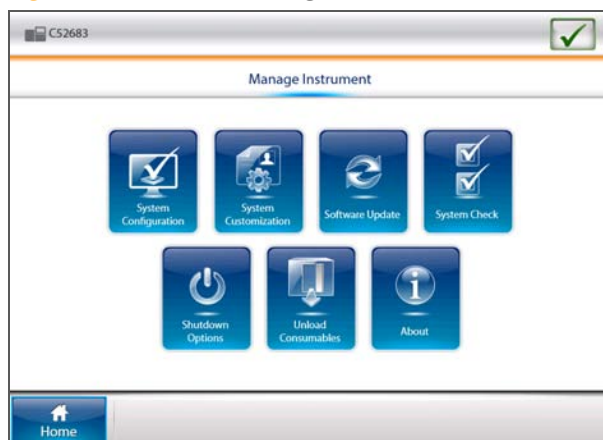
Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Le condizioni del sistema sono normali.
	Elaborazione	Il sistema è in fase di elaborazione.
	Avvertenza	Si è verificata un'avvertenza. Le avvertenze non arrestano una corsa o richiedono un intervento prima di poter procedere.
	Errore	Si è verificato un errore. Gli errori richiedono un intervento prima di poter procedere con la corsa.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona cambia per mostrare l'immagine associata e lampeggia per avvertire l'utente. Selezionare l'icona per aprire la finestra di stato e visualizzare una descrizione della condizione.

- Selezionare le voci elencate nella finestra per visualizzare una descrizione dettagliata della condizione verificatasi ed eventualmente le istruzioni per risolvere il problema.
- Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)

La schermata Manage Instrument (Gestione strumento) contiene le impostazioni per la configurazione e i controlli dello strumento.

Figura 10 Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)

Opzione	Volume e descrizione
System Configuration (Configurazione del sistema)	Fornisce l'opzione per modificare le impostazioni del sistema, come il nome della macchina, il dominio e la connettività. Vedere *Impostazioni della schermata System Configuration (Configurazione sistema)* a pagina 14.
System Customization (Personalizzazione sistema)	Fornisce le impostazioni opzionali del software per preferenze di visualizzazione, suono e nome strumento. Vedere *Personalizzazione del sistema* a pagina 16.
Software Update (Aggiornamento software)	Fornisce le opzioni per aggiornare il software dello strumento. Vedere *Aggiornamenti software* a pagina 42.
System Check (Verifica sistema)	Fornisce opzioni di risoluzione dei problemi per la verifica dello stato di funzionamento dei componenti del sistema. Vedere *Verifica del sistema* a pagina 55.
Shutdown Options (Opzioni di spegnimento)	Fornisce le opzioni per riavviare il software del sistema, per spegnere lo strumento o uscire su Windows. Vedere *Opzioni di spegnimento* a pagina 17.
Unload Consumables (Scarica materiali di consumo)	Scarica la cella a flusso e la cartuccia di reagenti e solleva i pescanti dalla cartuccia di tamponi e dal contenitore di reagenti usati.
About (Informazioni su)	Elenca le versioni software, il nome del computer, l'ID dello strumento e il numero di corse da eseguire sullo strumento.

Impostazioni della schermata System Configuration (Configurazione sistema)

Il sistema viene configurato durante l'installazione. Tuttavia, se è necessario eseguire una modifica, usare le opzioni di configurazione del sistema.

Opzione	Descrizione
Network Configuration (Configurazione della rete)	Fornisce le opzioni per le impostazioni di indirizzo IP, indirizzo del server di nomi di dominio (DNS), nome del computer e nome del dominio.
BaseSpace Configuration (Configurazione di BaseSpace)	Fornisce le opzioni per i metodi di analisi, compresi BaseSpace, BaseSpace Onsite, modalità indipendente e monitoraggio della corsa in BaseSpace nonchè le impostazioni per il login predefinito a BaseSpace e i report sulla salute dello strumento.

Le schermate di configurazione del sistema includono i comandi seguenti:

- **Back** (Indietro): ritorna alla schermata precedente.
- **Exit** (Esci): non salva le modifiche e torna alla schermata Manage Instrument (Gestione strumento).
- **Save** (Salva): salva le modifiche e passa alla schermata successiva.

Configurazione della rete

Opzione	Descrizione
IP address (Indirizzo IP)	Contattare l'amministratore di rete per gli indirizzi specifici per la struttura. **Obtain an IP address automatically** (Ottieni un indirizzo IP automaticamente): ottiene un indirizzo IP utilizzando il server DHCP. **Use the following IP address** (Usa l'indirizzo IP seguente): collega lo strumento a un'altra posizione server. • Immettere l'indirizzo IP. L'indirizzo IP è una serie di quattro numeri separati da un punto, ad esempio 168.62.20.37. • Immettere la maschera di sottorete, che è una sottodivisione della rete IP. • Immettere il gateway predefinito, che è un router sulla rete che collega a Internet
DNS address (Indirizzo DNS)	**Obtain a DNS address automatically** (Ottieni un indirizzo DNS automaticamente): legge l'indirizzo DNS associato con l'indirizzo IP. **Use the following DNS addresses** (Usa gli indirizzi DNS seguenti): collega lo strumento a un server che traduce i nomi di dominio in indirizzi IP. • Immettere l'indirizzo DNS prescelto. L'indirizzo DNS è il nome del server usato per tradurre i nomi di dominio in indirizzi IP. • Immettere l'indirizzo DNS alternativo. L'indirizzo alternativo è usato se il DNS prescelto non è in grado di tradurre un determinato nome di dominio in un indirizzo IP.

Opzione	Descrizione
Computer name (Nome del computer)	**Computer name** (Nome computer): il nome assegnato al computer dello strumento al momento della fabbricazione. Qualsiasi modifica eseguita al nome del computer può incidere sulla connettività e richiede un amministratore di rete. **Member of domain** (Membro di dominio): collega lo strumento a un dominio. Il dominio è il nome associato con la connessione Internet della struttura. Le modifiche al dominio richiedono un nome utente e una password di amministratore. **Member of work group** (Membro del gruppo di lavoro): se lo strumento non è collegato a Internet, specificare un nome per il gruppo di lavoro. Il nome del gruppo di lavoro è univoco per la struttura.

Configurazione di BaseSpace

Opzione	Descrizione
Analysis (Analisi)	**BaseSpace**: invia i dati di sequenziamento a Base Space Illumina. **BaseSpace Onsite** (BaseSpace Onsite): invia i dati di sequenziamento a BaseSpace Onsite. Immettere **Server Name** (Nome del server) per il server di BaseSpace Onsite. • [Opzionale] Per le opzioni BaseSpace o BaseSpace Onsite, selezionare la casella di controllo **Output Folder** (Cartella di output) e quindi selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione preferita. Questa impostazione salva una copia dei dati di sequenziamento (solo file BCL) in una posizione di rete. **Standalone Instrument** (Strumento indipendente): invia i dati di sequenziamento a una posizione sulla rete della struttura. Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare alla posizione preferita. Il software di controllo genera il nome della cartella di output. • [Opzionale] Selezionare **Use Run Monitoring** (Usa monitoraggio corsa) per monitorare la corsa utilizzando gli strumenti di visualizzazione disponibili su BaseSpace. È richiesto un login BaseSpace.
BaseSpace	Immettere un **User Name** (Nome utente) e una **Password** (Password) per registrare lo strumento con BaseSpace. Il nome utente e la password immessi possono essere impostati come credenziali di login predefinite. **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Usa login predefinito e bypassa la schermata di login di BaseSpace): imposta il nome utente e la password come login predefinito di BaseSpace e bypassa la schermata di BaseSpace durante l'impostazione della corsa. **Send instrument health information to Illumina** (Invia informazioni sulla salute dello strumento a Illumina): invia i file di registro a Illumina. Questa opzione non è disponibile con BaseSpace Onsite o con le configurazioni indipendenti.

Personalizzazione del sistema

Opzione	Descrizione
Start-Up Option (Opzione di avvio)	**Kiosk Mode** (Modalità kiosk): mostra l'interfaccia del software di controllo a schermo intero. Il software è progettato per l'uso in modalità kiosk. **Windows Mode** (Modalità Windows): permette l'accesso a Windows sul computer dello strumento. In questa modalità l'interazione con l'interfaccia software, come la posizione dei pulsanti, può essere alterata.
Keyboard and Audio (Tastiera e audio)	**Use on-screen keyboard** (Utilizza tastiera dello schermo): attiva la tastiera dello schermo per inserire informazioni nello strumento. In alternativa, collegare una tastiera a una porta USB esterna. **Play audio** (Audio): attiva gli indicatori audio per gli eventi seguenti: • Inizializzazione dello strumento • All'avvio di una corsa • Al verificarsi di determinati errori • Alla richiesta di interazione da parte dell'utente • Al termine di una corsa
Avatar Image (Immagine Avatar)	**Avatar Image** (Immagine Avatar): selezionare **Browse** (Sfoglia) per individuare un'immagine preferita per lo strumento. Nel campo Name (Nome), immettere un nome preferito per lo strumento. L'immagine e il nome vengono visualizzati nella parte superiore di ciascuna schermata.

Personalizzazione della corsa

Opzione	Descrizione
Advanced Load (Caricamento avanzato)	**Use Advanced Load Consumables** (Usa caricamento avanzato dei materiali di consumo): selezionare questa opzione per caricare i materiali di consumo da una singola schermata piuttosto che da una serie di schermate per l'impostazione della corsa. Vedere *Opzione avanzata di caricamento* a pagina 12.
Purge Consumables (Spurgo dei materiali di consumo)	**Purge Consumables at End of Run** (Spurgo dei materiali di consumo al termine della corsa): attivata per impostazione predefinita, questa impostazione, dopo una corsa, spurga automaticamente i reagenti non usati dalla cartuccia di reagenti al contenitore dei reagenti usati. Quando questa impostazione non è attivata, smaltire manualmente i reagenti non usati. Lo spurgo dei materiali di consumo impiega tempo aggiuntivo. Disattivare questa impostazione per una corsa indipendentemente utilizzando la funzione Edit (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa).
Skip Check Confirmation (Salta conferma verifica)	**Skip Pre-Run Check Confirmation** (Salta conferma verifica pre-corsa): selezionare questa impostazione per avviare automaticamente il sequenziamento dopo il completamento corretto di una verifica automatica. Se la verifica automatica non dovesse riuscire per qualsiasi ragione, risolvere l'errore prima di procedere.

Modifica delle impostazioni della corsa per spurgare i materiali di consumo

Modificare l'impostazione di spurgo dei materiali di consumo per una corsa indipendentemente dall'uso della funzione Edit (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa).

- **BaseSpace or BaseSpace Onsite configuration** (Configurazione di BaseSpace o BaseSpace Onsite): selezionare l'icona **Edit** (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa). Una volta terminato, selezionare l'icona **Save** (Salva).
- **Standalone configuration** (Configurazione su computer indipendente): selezionare l'icona **Edit** (Modifica) sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa). Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).

Opzioni di spegnimento

Le opzioni di spegnimento non sono richieste per il funzionamento normale.

Opzione	Descrizione
Shut Down (Spegni)	Spegne il software e l'alimentazione dello strumento. Vedere *Spegnimento dello strumento* a pagina 44.
Restart (Riavvia)	Riavvia Windows e il software di controllo e quindi inizializza lo strumento. Questo comando è di solito usato durante una sessione di risoluzione dei problemi o da un rappresentante Illumina.
Exit to Windows (Esci su Windows)	Chiude il software di controllo e accede direttamente al sistema operativo. Uscire su Windows per eseguire compiti amministrativi. Il funzionamento normale è eseguito dall'interfaccia software in modalità kiosk.

Sequencing Analysis Viewer (SAV)

Il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) mostra le metriche di sequenziamento generate durante la corsa. Le metriche vengono visualizzate sotto forma di grafici di dispersione, diagrammi e tabelle in base ai dati generati da RTA e scritti nei file InterOp. Le metriche vengono aggiornate man mano che la corsa procede. Selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualsiasi momento durante la corsa per visualizzare le metriche aggiornate. Per ulteriori informazioni, vedere *Guida per l'utente di Sequencing Analysis Viewer (SAV), (n. codice 15020619).*

SAV è incluso in NextSeq System Suite installato sul computer dello strumento. SAV può anche essere installato su un altro computer collegato alla stessa rete dello strumento per monitorare a distanza le metriche della corsa.

Durata della corsa di sequenziamento

La durata della corsa di sequenziamento dipende dal numero di cicli eseguiti.
La lunghezza massima di una corsa è una corsa paired-end di 150 cicli ciascuna lettura (2 x 150), più otto cicli ciascuna per due letture indice.

Per le durate previste e altre specifiche di sistema, visitare la pagina delle specifiche di NextSeq 500 sul sito Web Illumina.

Numero di cicli in una lettura

In una corsa di sequenziamento, il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Ad esempio, una corsa paired-end da 150 cicli esegue letture da 151 cicli (2 × 151) con un totale di 302 cicli. Al termine della corsa, si analizzano 2 × 150 cicli. Il ciclo extra è necessario per i calcoli di determinazione delle fasi (phasing) e di predeterminazione delle fasi (prephasing).

Apparecchiature e materiali di consumo forniti dall'utente

I materiali di consumo e l'attrezzatura seguenti sono utilizzati su NextSeq 500.

Materiali di consumo forniti dall'utente per le corse di sequenziamento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
1 N NaOH (idrossido di sodio)	Fornitore generico	Denaturazione della libreria, diluita a 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Fornitore generico	Denaturazione della libreria
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure di etanolo al 70%	VWR, n. catalogo 95041-714 (o equivalente) Fornitore generico	Pulizia della cella a flusso e per uso generico
Guanti monouso, privi di polvere lubrificante	Fornitore generico	Uso generale
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026 (o equivalente)	Pulizia della cella a flusso

Materiali di consumo forniti dall'utente per la manutenzione dello strumento

Materiali di consumo	Fornitore	Scopo
NaOCl, 5% (ipoclorito di sodio)	Sigma-Aldrich, n. di catalogo 239305 (o equivalente)	Lavaggio dello strumento utilizzando un lavaggio post-corsa manuale; diluito allo 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Lavaggio dello strumento utilizzando le opzioni di lavaggio manuale; diluito allo 0,05%
Acqua da laboratorio	Fornitore generico	Lavaggio dello strumento (lavaggio manuale)

Linee guida per l'acqua da laboratorio

Per eseguire le procedure dello strumento usare sempre acqua da laboratorio. Non usare mai acqua di rubinetto o acqua deionizzata. Quanto segue sono esempi accettabili di acqua da laboratorio:

- PW1 Illumina
- Acqua con resistività pari a 18 MΩ (Megaohm)
- Acqua Milli-Q
- Acqua Super-Q
- Acqua sterile per biologia molecolare

Apparecchiature fornite dall'utente

Apparecchio	Fornitore
Congelatore, temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, antibrina	Fornitore generico
Portaghiaccio	Fornitore generico
Frigorifero, temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C	Fornitore generico

Sequenziamento

Capitolo 2

Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento su NextSeq 500, preparare una cartuccia di reagenti e una cella a flusso, quindi seguire le indicazioni del software per impostare e avviare la corsa. La generazione di cluster e il sequenziamento sono integrati sullo strumento. Dopo la corsa, viene avviato automaticamente un lavaggio dello strumento usando i componenti già caricati sullo strumento.

Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e in seguito vengono sottoposte ad amplificazione per formare i cluster.

Sequenziamento

I cluster vengono sottoposi a imaging usando la chimica di sequenziamento a due canali e una combinazione di filtri specifici per ciascun terminatore di catena etichettato con coloranti fluorescenti. Al termine dell'imaging di una tile sulla cella a flusso, la tile successiva viene sottoposta a imaging. Il processo è ripetuto per ciascun ciclo di sequenziamento. Dopo l'analisi delle immagini, il software esegue l'identificazione delle basi, il filtraggio e il calcolo dei punteggi qualitativi.

Monitorare il progresso e le statistiche della corsa dall'interfaccia del software di controllo, dalla scheda Run (Corsa) su BaseSpace oppure da un computer sulla rete usando il software Sequencing Analysis Viewer (SAV). Vedere *Sequencing Analysis Viewer (SAV)* a pagina 17.

Analisi

Man mano che la corsa procede, il software di controllo trasferisce automaticamente i file di identificazione delle basi (BCL) a BaseSpace oppure alla posizione di output specificata per l'analisi secondaria.

In base all'applicazione sono disponibili diversi metodi di analisi. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di BaseSpace (help.basespace.illumina.com)*.

Flusso di lavoro per il sequenziamento

Per le configurazioni usando BaseSpace o BaseSpace Onsite Illumina: impostare la corsa sulla scheda Prep (Preparazione) di BaseSpace. Vedere la *Guida di BaseSpace (help.basespace.illumina.com)*.

Preparare una nuova cartuccia di reagenti: scongelarla e ispezionarla.

Preparare una nuova cella a flusso: portare a temperatura ambiente, togliere dalla confezione e ispezionare.

Denaturare e diluire le librerie (non si applica a tutti i tipi di libreria). Vedere *Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (n. codice 15048776)*.

Caricare la diluizione della libreria sulla cartuccia di reagenti nel serbatoio n. 10.

Dall'interfaccia software, selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per avviare la procedura di impostazione della corsa.

Caricare la cella a flusso.

Svuotare e ricaricare il contenitore dei reagenti usati.

Caricare la cartuccia di tamponi e la cartuccia di reagenti.

Riesaminare i parametri della corsa e i risultati della verifica automatica.

Selezionare **Start** (Avvio).

Monitorare il progresso della corsa dall'interfaccia del software di controllo, dalla scheda Run (Corsa) su BaseSpace oppure da un computer sulla rete usando Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Al termine del sequenziamento, viene avviato automaticamente un lavaggio dello strumento.

Preparazione della cartuccia di reagenti

1. Rimuovere la cartuccia di reagenti dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C.
2. Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente fino a scongelamento (circa 60 minuti). Non sommergere la cartuccia.
3. Picchiettare delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua dalla base, quindi asciugare la base.

NOTA
Metodo alternativo: scongelare i reagenti durante la notte alla temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. I reagenti richiedono un minimo di 18 ore per lo scongelamento. A questa temperatura, i reagenti sono stabili fino a una settimana.

4. Capovolgere per miscelare i reagenti.
5. Ispezionare le posizioni 29, 30, 31 e 32 per assicurarsi che i reagenti siano scongelati.
6. Picchiettare delicatamente sul banco per ridurre le bolle d'aria.

AVVERTENZA
Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Preparazione della cella a flusso

1 Rimuovere dalla confezione una nuova cella a flusso dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C.

2 Tenere la confezione aperta della cella a flusso a temperatura ambiente per 30 minuti.

NOTA
Se la confezione in alluminio è intatta, la cella a flusso può rimanere a temperatura ambiente fino a 12 ore. Evitare il raffreddamento e il riscaldamento ripetuti della cella a flusso.

3 Rimuovere la cella a flusso dalla confezione in alluminio.

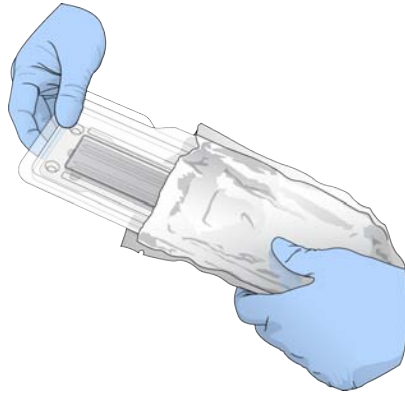
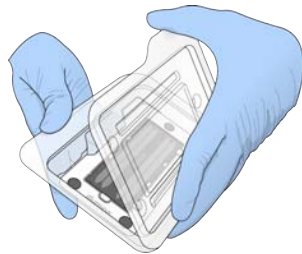
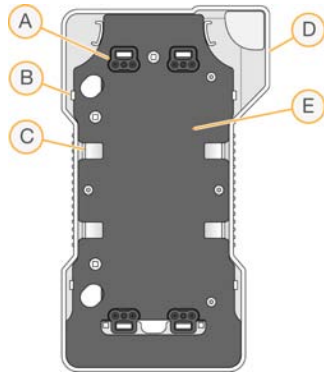
Figura 11 Rimozione dalla confezione in alluminio

4 Aprire la confezione in plastica trasparente a forma di conchiglia e rimuovere la cella a flusso.

Figura 12 Rimozione dalla confezione a forma di conchiglia

5 Pulire la superficie in vetro della cella a flusso con una salvietta imbevuta di alcool che non lascia residui. Asciugare il vetro con un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle.

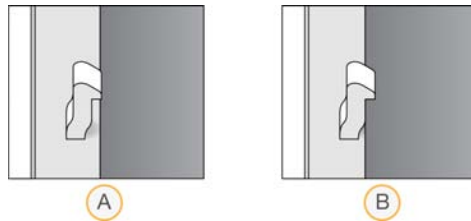
Ispezione della cella a flusso

1 Assicurarsi che le porte della cella a flusso non siano ostruite.

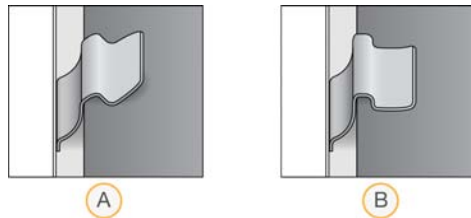
2 Assicurarsi che le guarnizioni della porta siano posizionate e che siano visibili le parti bianche in plastica.

Figura 13 Componenti della cella a flusso

A Guarnizioni porta (4)
B Clip di blocco (4)
C Clip a scatto (4)
D Struttura della cartuccia della cella a flusso
E Piastra di trasporto

3 Assicurarsi che le quattro clip di blocco bianche blocchino l'estremità della piastra di trasporto nera.
Se la piastra non è fissata sotto le clip, premere delicatamente assieme la piastra di trasporto nera e la struttura della cartuccia bianca fino a quando la piastra si blocca in posizione sotto le clip.

Figura 14 Ispezione delle clip di blocco

A Posizione errata: la clip di blocco non blocca l'estremità della piastra di trasporto.
B Posizione corretta: la clip di blocco blocca l'estremità della piastra di trasporto.

4 Assicurarsi che le quattro clip a scatto in metallo siano piatte sulla piastra di trasporto nera.

Figura 15 Ispezione delle clip a scatto

A Posizione errata: la clip a scatto non è piatta sulla piastra di trasporto.
B Posizione corretta: la clip a scatto è piatta sulla piastra di trasporto.

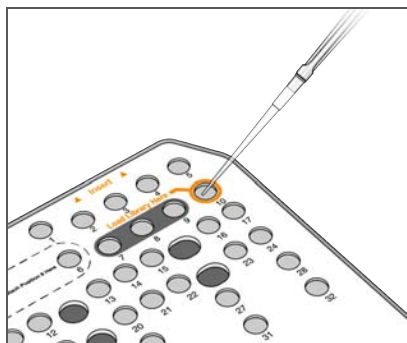
Preparazione delle librerie per il sequenziamento

Denaturazione e diluizione delle librerie

Se richiesto dal tipo di libreria, denaturare e diluire le librerie e aggiungere un campione di controllo PhiX. Il volume della libreria e la concentrazione di caricamento è diversa in base alla versione di NCS che si sta eseguendo. Per maggiori informazioni, vedere la *Denaturazione e diluizione delle librerie per il sistema NextSeq (n. codice 15048776)*.

Caricamento delle librerie sulla cartuccia di reagenti

1. Pulire il sigillo in alluminio che copre il serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Caricare qui la libreria) con un panno a bassissimo rilascio di particelle.
2. Perforare il sigillo con la punta di una pipetta pulita da 1 ml.
3. Caricare le librerie nel serbatoio n. 10 etichettato **Load Library Here** (Caricare qui la libreria). Non toccare il sigillo in alluminio mentre si erogano le librerie.

Figura 16 Caricamento delle librerie

Impostazione di una corsa di sequenziamento

Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Sequence** (Sequenziamento).

Il comando Sequence (Sequenziamento) apre lo sportello dello scomparto di imaging, rilascia i materiali di consumo di una corsa precedente e apre la serie di schermate per l'impostazione della corsa. Un breve ritardo è normale.

Se lo strumento è configurato per BaseSpace o BaseSpace Onsite, si apre la schermata di login di BaseSpace.

Schermata Log in to BaseSpace (Accedi a BaseSpace)

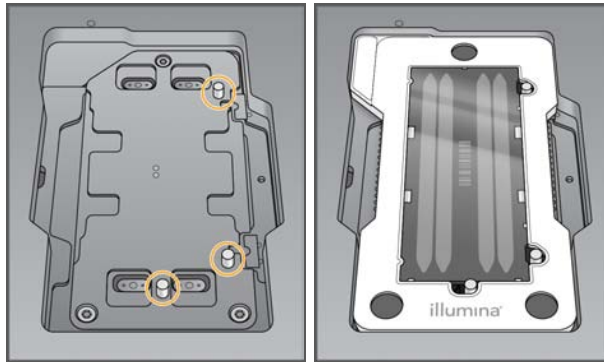
1 Immettere il proprio nome utente e password di BaseSpace.

2 Selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cella a flusso

1 Rimuovere la cella a flusso usata in una corsa precedente.

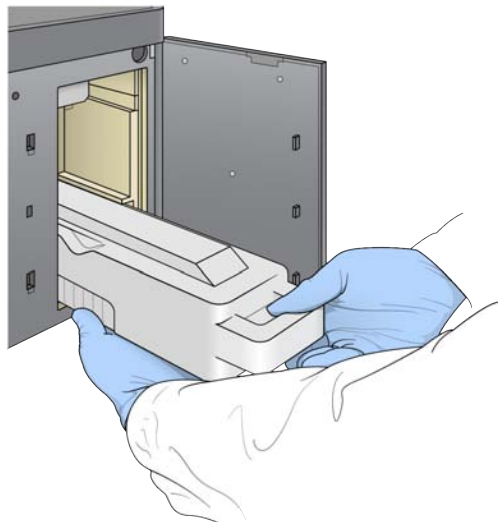
2 Utilizzare i perni di allineamento per posizionare la cella a flusso sul piano portacelle.

Figura 17 Caricamento della cella a flusso

3 Selezionare **Load** (Carica). Lo sportello si chiude automaticamente, l'ID della cella a flusso viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

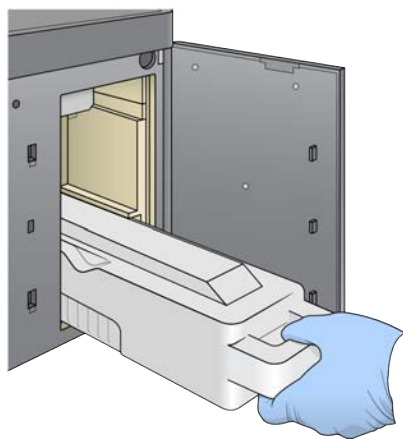
Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

1 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.

Figura 18 Rimozione del contenitore dei reagenti usati

NOTA
Mentre si rimuove il contenitore, posizionare l'altra mano sotto il contenitore per sostenerlo.

AVVERTENZA
Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

2 Fare scorrere il contenitore dei reagenti usati nello scomparto tamponi fino all'arresto. Quando il contenitore è in posizione si avverte un "clic".

Figura 19 Caricamento del contenitore dei reagenti usati

Caricamento della cartuccia di tamponi

1 Rimuovere la cartuccia di tamponi usata dallo scomparto superiore.

2 Fare scorrere una nuova cartuccia di tamponi nello scomparto tamponi fino all'arresto. Quando la cartuccia è in posizione si avverte un 'clic', l'ID della cartuccia di tamponi viene visualizzato sullo schermo e il sensore viene sottoposto a verifica.

Figura 20 Caricamento della cartuccia di tamponi

3 Chiudere lo sportello dello scomparto tamponi e selezionare **Next** (Avanti).

Caricamento della cartuccia di reagenti

1 Rimuovere la cartuccia di reagenti usata dallo scomparto reagenti. Smaltire i contenuti non utilizzati in base agli standard applicabili.

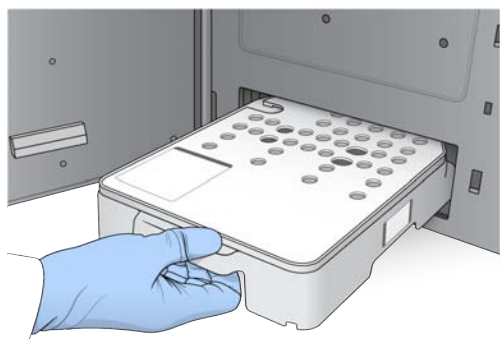
AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

NOTA

Per semplificare lo smaltimento sicuro dei reagenti non usati, il serbatoio in posizione 6 è rimovibile. Per maggiori informazioni, vedere *Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6* a pagina 31.

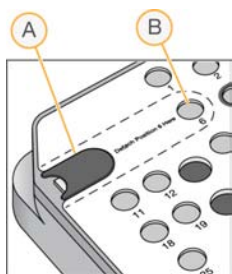
2 Fare scorrere la cartuccia di reagenti nello scomparto reagenti fino a quando la cartuccia si ferma in posizione, quindi chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

Figura 21 Caricamento della cartuccia di reagenti

3 Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta automaticamente la cartuccia in posizione (circa 30 secondi), l'ID della cartuccia viene visualizzato sulla schermata e i sensori sono sottoposti a verifica.

4 Selezionare **Next** (Avanti).

Rimozione del serbatoio usato dalla posizione n. 6

1. Dopo aver rimosso dallo strumento la cartuccia di reagenti ***usata***, rimuovere la copertura protettiva in gomma sopra la slot accanto alla posizione n. 6.

Figura 22 Posizione rimovibile n. 6

A Copertura protettiva in gomma
B Posizione n. 6

2. Premere la linguetta in plastica trasparente e quindi spingere verso sinistra per far fuoriuscire il serbatoio.
3. Smaltire il serbatoio in base agli standard applicabili.

Inserimento dei parametri della corsa

I passaggi visualizzati sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa) sono diversi in base alla configurazione del sistema:

- **BaseSpace o BaseSpace Onsite**: la schermata Run Setup (Impostazione corsa) elenca le corse che sono state impostate in BaseSpace. Se la corsa prevista non viene visualizzata sulla schermata Run Setup (Impostazione corsa), assicurarsi che la corsa sia selezionata per il sequenziamento in BaseSpace.
- **Computer autonomo**: la schermata Run Setup (Impostazione corsa) include i campi per la definizione dei parametri della corsa.

Selezione delle corse disponibili (configurazione BaseSpace)

1. Selezionare un nome della corsa dall'elenco delle corse disponibili.
   Usare le frecce verso l'alto e verso il basso per scorrere nell'elenco o inserire un nome della corsa nel campo Search (Cerca).
2. Selezionare **Next** (Avanti).
3. Confermare i parametri della corsa.
   - **Run Name** (Nome corsa): il nome della corsa come assegnato in BaseSpace.
   - **Library ID** (ID libreria): il nome delle librerie sottoposte a pooling come assegnato in BaseSpace.
   - **Recipe** (Ricetta): il nome della ricetta, **NextSeq High** o **NextSeq Mid**, in base alla cartuccia di reagenti usata per la corsa.
   - **Read Type** (Tipo lettura): Single Read (Lettura unidirezionale) oppure Paired-End (Lettura paired-end).
   - **Read Length** (Lunghezza lettura): il numero di cicli per ciascuna lettura.
   - [Opzionale] Custom Primers (Primer custom), se applicabile.
4. [Opzionale] Selezionare l'icona **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).

- **Run parameters** (Parametri della corsa): cambiare il numero di letture o il numero di cicli per lettura.
- **Custom primers** (Primer personalizzati): cambiare le impostazioni per i primer personalizzati. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)*.
- **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa corrente. Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 16.

5 Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento dei parametri della corsa (configurazione su computer autonomo)

1 Immettere un nome della corsa scelto dall'utente.

2 [Opzionale] Immettere un ID della libreria scelto dall'utente.

3 Dall'elenco a discesa Recipe (Ricetta), selezionare una ricetta. Sono elencate solo le ricette compatibili.

4 Selezionare un tipo di lettura, **Single Read** (Unidirezionale) oppure **Paired End** (Paired-end).

5 Inserire il numero di cicli per ciascuna lettura nella corsa di sequenziamento.
- **Read 1** (Lettura 1): immettere un valore fino a 151 cicli.
- **Read 2** (Lettura 2): immettere un valore fino a 151 cicli. Questo valore è di solito lo stesso numero di cicli di Read 1 (Lettura 1).
- **Index 1** (Indice 1): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 1 (i7).
- **Index 2** (Indice 2): immettere il numero di cicli richiesti per il primer Index 2 (i5).

Il software di controllo conferma le voci immesse in base ai criteri seguenti:
- I cicli totali non devono superare il numero di cicli massimi permesso
- I cicli per Lettura 1 sono superiori ai 5 cicli usati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster
- I cicli Lettura Indici non superano i cicli Lettura 1 e Lettura 2

6 [Opzionale] Se si stanno usando primer personalizzati, selezionare la casella di controllo per i primer usati. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per i primer personalizzati NextSeq (n. codice 15057456)*.
- **Read 1** (Lettura 1): primer personalizzato per Read 1 (Lettura 1).
- **Read 2** (Lettura 2): primer personalizzato per Read 2 (Lettura 2).
- **Index 1** (Indice 1): primer personalizzato per Index 1 (Indice 1).
- **Index 2** (Indice 2): primer personalizzato per Index 2 (Indice 2).

7 [Opzionale] Selezionare l'icona **Edit** (Modifica) per modificare i parametri della corsa. Una volta terminato, selezionare **Save** (Salva).
- **Output folder location** (Posizione cartella di output): modificare la posizione della cartella di output per la corsa attuale. Selezionare **Browse** (Sfoglia) e andare alla posizione di rete prescelta.
- **Purge consumables for this run** (Spurgo dei materiali di consumo per questa corsa): modificare questa impostazione per spurgare automaticamente i materiali di consumo dopo la corsa corrente. Per maggiori informazioni, vedere *Personalizzazione della corsa* a pagina 16.

- **Use run monitoring for this run** (Usa monitoraggio corsa per questa corsa): modificare questa impostazione per utilizzare il monitoraggio della corsa in BaseSpace.

8 Selezionare **Next** (Avanti).

Revisione della verifica automatica

Il software esegue una verifica automatica del sistema. Durante la verifica, gli indicatori seguenti vengono visualizzati sulla schermata:

- **Segno di spunta grigio**: la verifica non è ancora stata eseguita.
- **Icona di progresso** : la verifica è in corso.
- **Segno di spunta verde**: la verifica è stata superata.
- **X rossa**: la verifica non è stata superata. Per qualsiasi voce che non supera la verifica, è richiesta un'azione prima di poter procedere. Vedere *Risoluzione dei errori della verifica automatica* a pagina 49.

Per arrestare una verifica automatica in corso, selezionare l'icona nell'angolo inferiore destro. Per riavviare la verifica, selezionare l'icona . La verifica riprende dalla prima verifica completata o non superata.

Per visualizzare i risultati di ciascuna singola verifica entro una categoria, selezionare l'icona per allargare la categoria.

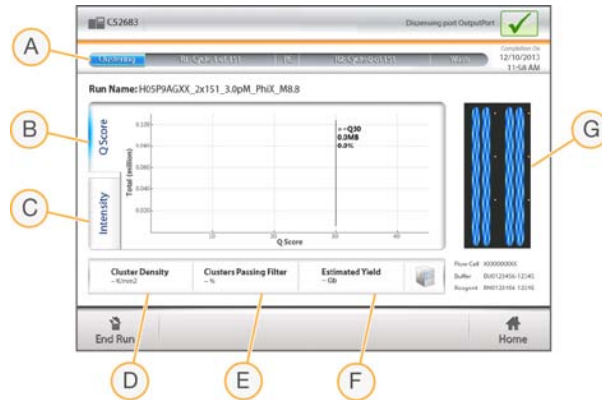
Avvio della corsa

Al termine della verifica automatica, selezionare **Start** (Avvia). La corsa di sequenziamento viene avviata.

Per configurare il sistema per avviare una corsa automaticamente dopo una verifica, selezionare *Personalizzazione della corsa* a pagina 16.

Monitoraggio del progresso della corsa

Monitorare il progresso della corsa, le intensità e i punteggi qualitativi mentre le metriche vengono visualizzate sulla schermata.

Figura 23 Progresso e metriche della corsa di sequenziamento

A **Progresso della corsa**: mostra la fase in corso di elaborazione e il numero di cicli completati per ciascuna lettura. La barra di progresso non è proporzionale alla velocità della corsa di ciascuna fase. Usare il tempo rimanente indicato nell'angolo superiore destro per determinare la durata attuale.

B **Q-Score** (Punteggi qualitativi): mostra la distribuzione dei punteggi qualitativi. Vedere *Punteggio qualitativo* a pagina 65.

C **Intensity** (Intensità): mostra il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile per ciascuna tile. I colori del grafico indicano ciascuna base: rosso è A, verde è C, blu è G e nero è T. I colori corrispondono agli indicatori delle basi utilizzati in Sequencing Analysis Software (SAV).

D **Cluster Density (K/mm²)** (Densità dei cluster - K/mm²): mostra il numero di cluster rilevato per la corsa.

E **Clusters Passing Filter (%)** (Cluster che attraversano il filtro - %): mostra la percentuale di cluster che attraversano il filtro. Vedere *Cluster che attraversano il filtro* a pagina 62.

F **Estimated Yield (Gb)** (Resa prevista - Gb): mostra il numero di basi previste per la corsa.

G **Immagine della cella a flusso**: mostra quale coppia di corsie è sottoposte a imaging mentre l'altra coppia di corsie è in una fase della chimica.

NOTA
Dopo aver selezionato Home (Inizio), non è possibile tornare a visualizzare le metriche della corsa. Tuttavia, le metriche della corsa sono accessibili su BaseSpace o visualizzabili da un computer autonomo usando Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Cicli per le metriche della corsa

Le metriche della corsa vengono visualizzate in diversi punti in una corsa.

- Durante le fasi di generazione di cluster non appare alcuna metrica.
- I primi cinque cicli sono riservati per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
- Le metriche della corsa appaiono dopo il ciclo 25, inclusi densità dei cluster, cluster che attraversano il filtro, rendimento e punteggi qualitativi.

Trasferimento dei dati

In base alla configurazione per l'analisi selezionata, durante la corsa, viene visualizzata sullo schermo un'icona per indicare lo stato del trasferimento dati.

Stato	BaseSpace Illumina	BaseSpace Onsite	Strumento autonomo
Collegato			
Collegato e in fase di trasferimento dati			
Scollegato			

Se durante la corsa viene interrotto il trasferimento dei dati, i dati vengono archiviati temporaneamente sul computer dello strumento. Quando la connessione viene ripristinata, il trasferimento dei dati riprende automaticamente. Se la connessione non viene ripristinata prima del termine della corsa, i dati devono essere rimossi manualmente dal computer dello strumento prima di poter avviare una nuova corsa.

Run Copy Service (Esecuzione servizio copia)

NextSeq System Software Suite introduce Run Copy Service (Esecuzione servizio copia). RTA v2 richiede il servizio di copia dei file da una posizione di origine a una posizione di destinazione e il servizio esegue la copia desiderata nell'ordine ricevuto. Nel caso si verifichi un'eccezione, il file viene rimesso in coda per la copia in base al numero di file nella coda di copia.

Lavaggio post-corsa automatico

Al completamento della corsa di sequenziamento, il software avvia un lavaggio post-corsa automatico usando la soluzione di lavaggio fornita nella cartuccia di tamponi e NaOCl fornito nella cartuccia di reagenti.

Il lavaggio post-corsa automatico dura circa 90 minuti. Al termine del lavaggio, il pulsante Home (Inizio) diventa attivo. Durante il lavaggio, i risultati del sequenziamento rimangono visibili sulla schermata.

NOTA
Il lavaggio post-corsa automatico pompa la soluzione di lavaggio nel sistema dalla cartuccia di tamponi ai recipienti di lavaggio riservati nella cartuccia di reagenti, quindi al contenitore dei reagenti usati.

Dopo il lavaggio

Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare le cartucce in posizione fino alla corsa successiva.

Manutenzione

Capitolo 3

Introduzione

Le procedure di manutenzione comprendono i lavaggi manuali dello strumento e, quando disponibili, gli aggiornamenti del software del sistema.

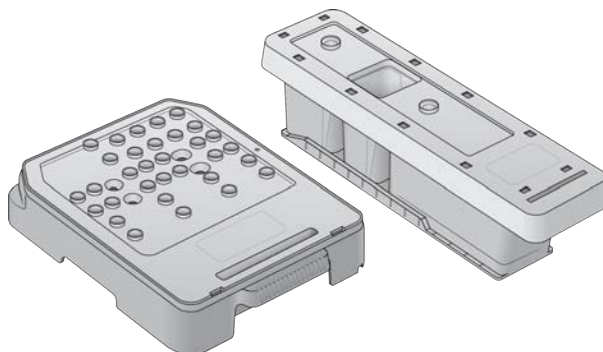
- **Lavaggi dello strumento**: un lavaggio post-corsa automatico dopo ciascuna corsa di sequenziamento mantiene le prestazioni dello strumento. Tuttavia, un lavaggio manuale è richiesto periodicamente in determinate condizioni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale* a pagina 39.
- **Aggiornamenti software**: quando è disponibile una versione aggiornata del software del sistema, è possibile installare l'aggiornamento automaticamente mediante una connessione a BaseSpace oppure manualmente dopo aver scaricato l'installer dalla pagina Web Illumina. Vedere *Aggiornamenti software* a pagina 42.

Esecuzione di un lavaggio manuale

I lavaggi manuali sono avviati dalla schermata Home (Inizio). Le opzioni di lavaggio comprendono Quick Wash (Lavaggio rapido) e Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale).

Tipi di lavaggio	Descrizione
Quick Wash (Lavaggio rapido) **Durata: 20 minuti**	Lava il sistema con una soluzione di lavaggio fornita dall'utente composta da acqua da laboratorio e Tween 20 (cartuccia dei tamponi di lavaggio). Richiesto ogni 14 giorni se lo strumento è rimasto inattivo o è stato spento.
Lavaggio post-corsa manuale **Durata: 90 minuti**	Lava il sistema con una soluzione di lavaggio fornita dall'utente composta da acqua da laboratorio e Tween 20 (cartuccia dei tamponi di lavaggio) e ipoclorito di sodio allo 0,12% (cartuccia dei reagenti di lavaggio). Richiesto se non è stato eseguito il lavaggio post-corsa automatico.

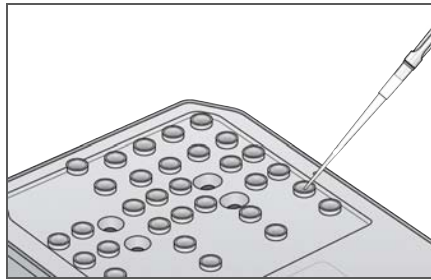
Un lavaggio manuale richiede la cartuccia dei reagenti di lavaggio e la cartuccia dei tamponi di lavaggio forniti con lo strumento e una cella a flusso usata. Una cella a flusso usata può essere utilizzata fino a 20 volte per i lavaggi dello strumento.

Figura 24 Cartuccia dei reagenti di lavaggio e cartuccia dei tamponi di lavaggio

Preparazione per Manual Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa manuale)

Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
• NaOCl	1 ml, diluito a 0,12% Caricato sulla cartuccia dei reagenti di lavaggio (posizione n. 28).
• Tween 20 100% • Acqua da laboratorio	Utilizzata per creare 125 ml di soluzione di lavaggio di 0,05% Tween 20 Caricata sulla cartuccia dei tamponi di lavaggio (serbatoio centrale)

NOTA
Usare sempre una diluizione di NaOCl fresca preparata nelle ultime **24 ore**. Se si prepara un volume superiore a 1 ml, conservare la diluizione residua a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C da utilizzare nelle successive 24 ore. Altrimenti, smaltire la diluizione residua di NaOCl.

1 Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per ottenere 1 ml di 0,12% NaOCl:
   - 5% NaOCl (24 µl)
   - Acqua da laboratorio (976 µl)
2 Capovolgere la provetta per miscelare.
3 Aggiungere 1 ml di 0,12% NaOCl alla cartuccia dei reagenti di lavaggio. Il recipiente corretto corrisponde alla posizione n. **28** sulla cartuccia precaricata.

Figura 25 Caricamento di NaOCl

4 Combinare i seguenti volumi per ottenere una soluzione di lavaggio di 0,05% Tween 20:
   - 100% Tween 20 (62 µl)
   - Acqua da laboratorio (125 ml)
5 Aggiungere 125 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia dei tamponi di lavaggio.
6 Selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio) quindi **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale).

Preparazione per Quick Wash (Lavaggio rapido)

Materiali di consumo forniti dall'utente	Volume e descrizione
• Tween 20 100% • Acqua da laboratorio	Utilizzata per creare 40 ml di soluzione di lavaggio di 0,05% Tween 20 Caricata sulla cartuccia dei tamponi di lavaggio (serbatoio centrale)

1 Combinare i seguenti volumi per ottenere una soluzione di lavaggio di 0,05% Tween 20:
   - 100% Tween 20 (20 µl)
   - Acqua da laboratorio (40 ml)
2 Aggiungere 40 ml di soluzione di lavaggio al serbatoio centrale della cartuccia dei tamponi di lavaggio.
3 Selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio) quindi selezionare **Quick Wash**

(Lavaggio rapido).

Caricamento di una cella a flusso usata e delle cartucce di lavaggio

1. Se non è presente una cella a flusso usata, caricare una cella a flusso usata. Selezionare **Load** (Carica) e quindi **Next** (Avanti).
2. Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in base agli standard applicabili.

AVVERTENZA
Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumenti da laboratorio. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base agli standard di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

3. Fare scorrere il contenitore dei reagenti usati nello scomparto tamponi fino all'arresto.
4. Rimuovere la cartuccia dei tamponi usata nella corsa precedente, se presente.
5. Caricare la cartuccia dei tamponi di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio.
6. Rimuovere la cartuccia dei reagenti usata nella corsa precedente, se presente.
7. Caricare la cartuccia dei reagenti di lavaggio.
8. Selezionare **Next** (Avanti). La verifica pre-lavaggio si avvia automaticamente.

Avvio del lavaggio

1. Selezionare **Start** (Avvio).
2. Al termine del lavaggio, selezionare **Home** (Inizio).

Dopo il lavaggio

Dopo il lavaggio, i pescanti rimangono nella posizione abbassata per impedire che aria entri nel sistema. Lasciare le cartucce in posizione fino alla corsa successiva.

Aggiornamenti software

Gli aggiornamenti software sono confezionati in un gruppo di software denominato System Suite, che include:

- NextSeq Control Software (NCS)
- Ricette NextSeq
- RTA v2
- NextSeq Service Software (NSS)
- Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- BaseSpace Broker

Gli aggiornamenti software possono essere installati automaticamente utilizzando una connessione Internet o manualmente da una rete o una posizione USB.

- **Automatic updates** (Aggiornamenti automatici): per gli strumenti collegati a una rete con accesso a Internet, quando è disponibile un aggiornamento software viene visualizzata l'icona sul pulsante Manage Instrument (Gestione strumento) sulla schermata Home (Inizio).
- **Manual updates** (Aggiornamenti manuali): scaricare l'installer di System Suite dalla pagina di supporto di NextSeq 500 sul sito Web Illumina.

Aggiornamento software automatico

1. Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
2. Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
3. Selezionare **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Installare l'aggiornamento già scaricato da BaseSpace).
4. Selezionare **Update** (Aggiorna) per avviare l'aggiornamento. Si apre una finestra di dialogo di conferma del comando.
5. Attenersi alle istruzioni della procedura guidata all'installazione:
   a. Accettare il contratto di licenza.
   b. Rivedere le note sulla versione.
   c. Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

   Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.

NOTA
Se è compreso un aggiornamento del firmware, è richiesto un riavvio automatico del sistema dopo l'aggiornamento del firmware.

Aggiornamento software manuale

1. Scaricare l'installer di System Suite dalla pagina Web Illumina e salvarlo in una posizione di rete.
   In alternativa, copiare il file di installazione del software su un dispositivo USB portatile.
2. Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento)
3. Selezionare **Software Update** (Aggiornamento software).
4. Selezionare **Manually install the update from the following location** (Installare manualmente l'aggiornamento dalla posizione seguente).

5 Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla posizione della cartella in cui si trova il file di installazione del software, quindi selezionare **Update** (Aggiorna).

6 Attenersi alle istruzioni della procedura guidata all'installazione:
   a Accettare il contratto di licenza.
   b Rivedere le note sulla versione.
   c Rivedere l'elenco di software inclusi nell'aggiornamento.

   Al termine dell'aggiornamento, il software di controllo si riavvia automaticamente.

NOTA
Se è compreso un aggiornamento del firmware, è richiesto un riavvio automatico del sistema dopo l'aggiornamento del firmware.

Spegnimento dello strumento

1. Selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
2. Selezionare **System Power Options** (Opzioni di alimentazione del sistema).
3. Selezionare **Shut Down** (Spegnimento).
   Il comando Shut Down (Spegni) spegne in sicurezza il software e spegne lo strumento. Attendere almeno 60 secondi prima di accendere nuovamente lo strumento.

ATTENZIONE
Non riposizionare lo strumento. Uno spostamento dello strumento non eseguito nel modo appropriato può incidere sull'allineamento ottico e compromettere l'integrità dei dati. Nel caso sia necessario spostare lo strumento, rivolgersi al rappresentante Illumina.

Risoluzione dei problemi

Capitolo 4

Introduzione

Per eventuali domande tecniche, visitare le pagine di supporto di NextSeq 500 sul sito Web Illumina. Le pagine di supporto forniscono l'accesso a documentazione, download e domande frequenti.

Accedere all'account MyIllumina per accedere ai bollettini di supporto.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina. Vedere *Assistenza tecnica* a pagina 77.

Prendere in considerazione la possibilità di condividere un link al riepilogo della corsa in BaseSpace con l'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi.

File di risoluzione dei problemi

Un rappresentante dell'Assistenza tecnica Illumina può richiedere copie dei file specifici della corsa o della scansione per risolvere il problema. Di solito, i file seguenti sono utilizzati per la risoluzione dei problemi.

File principale	Cartella	Descrizione
File informazioni corsa (RunInfo.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le informazioni seguenti: • Nome della corsa • Numero di cicli per la corsa • Numero di cicli in ciascuna lettura • Se la lettura è una lettura indicizzata • Numero di strisce e tile sulla cella a flusso
File parametri della corsa (RunParameters.xml)	Cartella della corsa (livello base)	Contiene le informazioni relative ai parametri della corsa e ai componenti della corsa. Le informazioni comprendono l'etichetta RFID, il numero di serie, il numero di parte e la data di scadenza.
File configurazione RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene le impostazioni della configurazione di RTA per la corsa. Il file RTAConfiguration.xml viene creato all'inizio della corsa.
File InterOp (*.bin)	InterOp	File report binari usati per Sequencing Analysis Viewer. I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa.
File di registro	Logs	I file di registro descrivono ciascuna fase eseguita dallo strumento per ciascun ciclo ed elenca le versioni software e firmware usate per la corsa. Il file denominato [Nome strumento]_ Hardwareattuale.csv elenca i numeri di serie dei componenti dello strumento.
File registro errori (*ErrorLog*.txt)	Registri RTA	Registro degli errori di RTA. I file registro errori sono aggiornati ogni volta che si verifica un errore.
File registro globale (*GlobalLog*.tsv)	Registri RTA	Registro di tutti gli eventi RTA. I file registro globale sono aggiornati durante tutta la corsa.
File registro corsia (*LaneLog*.txt)	Registri RTA	Registro degli eventi di elaborazione di RTA. I file registro corsia sono aggiornati durante tutta la corsa.

Errori di RTA

Per risolvere gli errori di RTA, controllare prima il registro degli errori di RTA, che è archiviato nella cartella RTALogs. Questo file non è presente per le corse prive di errori. Includere il registro degli errori quando si comunicano i problemi all'Assistenza tecnica Illumina.

Live Help (Assistenza in diretta)

La funzione Live Help (Assistenza in diretta) collega lo strumento direttamente al personale dell'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi. Con il permesso dell'utente, un rappresentante dell'Assistenza tecnica Illumina può visualizzare lo schermo e condividere il controllo dello strumento. L'utente mantiene il controllo prioritario sullo strumento e può mettere fine alla sessione di condivisione della schermata in qualsiasi momento.

Per abilitare Live Help (Assistenza in diretta), lo strumento deve essere collegato a una rete con accesso a Internet.

Condivisione del desktop

1 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **Shutdown Options** (Opzioni di spegnimento).

2 Dalla schermata Shutdown Options (Opzioni di spegnimento), selezionare **Exit to Windows** (Esci su Windows).

3 Aprire un browser e andare alla pagina Web support.illumina.com/share_desktop.html. Si apre la finestra di dialogo Share Your Desktop (Condividi il desktop).

4 Chiamare l'Assistenza tecnica Illumina per ricevere un codice di accesso univoco.

5 Immettere il codice di accesso univoco nel campo Access Code (Codice di accesso).

Figura 26 Campo del codice di accesso per la condivisione del desktop

6 Fare clic su **Continue** (Continua). Si avvia la sessione di condivisione della schermata.

7 Per terminare la sessione di condivisione della schermata, selezionare **Home** (Inizio).

Risoluzione dei errori della verifica automatica

Se si verificano errori durante la verifica automatica, utilizzare le azioni seguenti raccomandate per risolvere l'errore.

Se la verifica pre-corsa non viene superata, l'etichetta RFID della cartuccia di reagenti non viene bloccata e può essere usata per una corsa successiva. Tuttavia, l'etichetta RFID viene bloccata dopo che i sigilli in alluminio sono stati perforati.

Verifiche del sistema	Azione raccomandata
Doors Closed (Sportelli chiusi)	Assicurarsi che gli sportelli dello scomparto siano chiusi.
Consumables Loaded (Materiali di consumo caricati)	I sensori dei materiali di consumo non eseguono la registrazione. Assicurarsi che ciascun materiale di consumo sia caricato correttamente. Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla fase di caricamento e ripetere l'impostazione della corsa.
Required Software (Software richiesto)	I componenti critici del software sono mancanti. Eseguire un aggiornamento manuale del software per ripristinare i componenti del software.
Instrument Disk Space (Spazio su disco dello strumento)	Il disco rigido dello strumento non ha spazio su disco sufficiente per eseguire una corsa. I dati di una corsa precedente potrebbero non essere stati trasferiti. Liberare i dati della corsa dal disco rigido dello strumento.
Network Connection (Connessione rete)	La connessione alla rete è stata interrotta. Verificare lo stato della rete e confermare la connessione fisica alla rete.
Network Disk Space (Spazio su disco della rete)	L'account BaseSpace è pieno o il server della rete è pieno.

Temperature (Temperatura)	Azione raccomandata
Temperature (Temperatura)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Temperature Sensors (Sensori della temperatura)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Fans (Ventole)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Sistema di imaging	Azione raccomandata
Imaging Limits (Limiti di imaging)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Z Steps-and-Settle (Fasi e arresto Z)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Bit Error Rate (Frequenza bit errore)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Sistema di imaging	Azione raccomandata
Flow Cell Registration (Registrazione cella a flusso)	La cella a flusso potrebbe essere in posizione errata. • Sulle schermate per l'impostazione della corsa, selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla fase della cella a flusso. Lo sportello dello scomparto di imaging si apre. • Scaricare e ricaricare la cella a flusso per assicurarsi che sia posizionata correttamente.

Erogazione dei reagenti	Azione raccomandata
Valve Response (Risposta valvola)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Pump (Pompa)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Buffer Mechanism (Meccanismo tampone)	Contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
Spent Reagents Empty (Contenitore dei reagenti usati vuoto)	Svuotare il contenitore dei reagenti usati e ricaricare il contenitore vuoto.

Contenitore dei reagenti usati pieno

Iniziare sempre una corsa con un contenitore dei reagenti usati vuoto.

Se si inizia una corsa senza svuotare il contenitore dei reagenti usati, i sensori del sistema indicano al software di mettere in pausa la corsa quando il contenitore è pieno. I sensori del sistema non possono mettere in pausa una corsa durante la generazione di cluster, la risintesi paired-end o un lavaggio post-corsa automatico.

Quando la corsa è in pausa, si apre una finestra di dialogo con le opzioni per sollevare i pescanti e svuotare il contenitore pieno.

Svuotamento del contenitore dei reagenti usati

1. Selezionare **Raise Sippers** (Solleva pescanti).
2. Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in modo appropriato.
3. Rimettere il contenitore vuoto nello scomparto tamponi.
4. Selezionare **Continue** (Continua). La corsa riprende automaticamente.

Flusso di lavoro di reibridazione

Una corsa di reibridazione potrebbe essere necessaria se le metriche generate durante i primi pochi cicli mostrano intensità inferiori a 2500. Alcune librerie a bassa diversità possono mostrare intensità inferiori a 1000, il che è previsto e non può essere risolto con la reibridazione.

NOTA

Il comando End Run (Termina corsa) è definitivo. La corsa non può essere ripresa, i materiali di consumo della corsa non possono essere riutilizzati e i dati di sequenziamento della corsa non sono salvati.

Quando viene terminata una corsa, il software esegue i passaggi seguenti prima di terminare la corsa:

- Pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- Sblocca l'etichetta RFID della cella a flusso per una corsa successiva.
- Assegna alla cella a flusso una data di scadenza per la reibridazione.
- Scrive i registri della corsa per i cicli completati. Un ritardo è normale.
- Bypassa il lavaggio post-corsa automatico.

Quando viene avviata una corsa di reibridazione, il software esegue i passaggi seguenti prima di eseguire la corsa:

- Crea una cartella per la corsa in base a un nome univoco per la corsa.
- Verifica che la data della cella a flusso per la reibridazione non sia scaduta.
- Esegue il priming dei reagenti. Un ritardo è normale.
- Salta il passaggio di generazione di cluster.
- Rimuove il primer Lettura 1 precedente.
- Ibridizza un primer Lettura 1 fresco.
- Prosegue con la Lettura 1 e il resto della corsa in base ai parametri specificati della corsa.

Momenti in cui terminare una corsa per la reibridazione

La reibridazione successiva è possibile solo se si termina la corsa nei momenti seguenti:

- **Dopo il ciclo 5**: le intensità appaiono dopo la registrazione della griglia, che richiede i primi 5 cicli di sequenziamento. Sebbene sia sicuro terminare una corsa dopo il ciclo 1, si raccomanda di terminare una corsa dopo il ciclo 5. Non terminare una corsa durante la generazione di cluster.
- **Lettura 1 o Lettura Indice 1**: terminare la corsa ***prima*** dell'avvio della risintesi paired-end. La cella a flusso non può essere salvata per le successiva reibridazione dopo l'avvio della risintesi paired-end.

Materiali di consumo necessari

Una corsa di reibridazione richiede una nuova cartuccia di reagenti e una nuova cartuccia di tamponi NextSeq indipendentemente da quando è stata arrestata la corsa.

Terminazione della corsa attuale

1 Selezionare **End Run** (Termina corsa). Quando richiesto di confermare il comando, selezionare **Yes** (Sì).

2 Quando richiesto di salvare la cella a flusso, selezionare **Yes** (Sì). Annotare la data di scadenza per la reibridazione.

3 Rimuovere la cella a flusso salvata e metterla da parte a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a quando si è pronti a impostare la corsa di reibridazione.

NOTA
È possibile conservare la cella a flusso fino a 7 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C nella confezione in plastica trasparente a forma di conchiglia ***senza*** la confezione essiccante. Per ottenere i risultati migliori, reibridare la cella a flusso salvata entro 3 giorni.

Esecuzione di un lavaggio manuale

1 Dalla schermata Home (Inizio), selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio).

2 Dalla schermata Wash Selection (Selezione lavaggio), selezionare **Manual Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa manuale). Vedere *Esecuzione di un lavaggio manuale* a pagina 39.

NOTA
Se la cartuccia di reagenti e la cartuccia di tamponi non sono ancora state rimosse dalla corsa arresta, è possibile utilizzare queste cartucce per il lavaggio manuale. In caso contrario eseguire un lavaggio manuale con la cartuccia dei reagenti di lavaggio e la cartuccia dei tamponi di lavaggio.

Impostazione di una nuova corsa sulla scheda BaseSpace Prep (Preparazione BaseSpace)

Se lo strumento è configurato per BaseSpace o BaseSpace Onsite impostare una nuova corsa sulla scheda Prep (Preparazione) usando gli stessi parametri della corsa originale.

SUGGERIMENTO
Fare clic sulla scheda Pools (Pool), selezionare l'ID del pool appropriato per mantenere le impostazioni della corsa precedente e quindi assegnare un nome univoco alla nuova corsa.

Impostazione di una corsa sullo strumento

1 Preparare una nuova cartuccia di reagenti.

2 Se la cella a flusso salvata è stata conservata, permettere alla cella a flusso di raggiungere la temperatura ambiente (15-30 minuti).

3 Caricare la cella a flusso salvata.

4 Rimuovere il contenitore dei reagenti usati e smaltirne i contenuti in modo appropriato, quindi ricaricare il contenitore vuoto.

5 Caricare la cartuccia di tamponi e la cartuccia di reagenti nuove.

6 Dalla schermata Run Setup (Impostazione corsa), selezionare le opzioni seguenti:
- **BaseSpace o BaseSpace Onsite**: selezionare la corsa e confermare i parametri della corsa.
- **Computer indipendente**: immettere il nome della corsa e specificare gli stessi parametri della corsa originale.

7 Selezionare **Next** (Successivo) per procedere alla verifica pre-corsa e avviare la corsa.

Ricette personalizzate e cartelle delle ricette

Non modificare le ricette originali. Fare sempre una copia della ricetta originale assegnandole un nuovo nome. Se una ricetta originale è stata modificata, il programma di aggiornamento software non riconosce più la ricetta per gli ultimi aggiornamenti e le nuove versioni non vengono installate.

Archiviare le ricette personalizzate nella cartella delle ricette appropriata. Le cartelle delle ricette sono organizzate nel modo seguente:

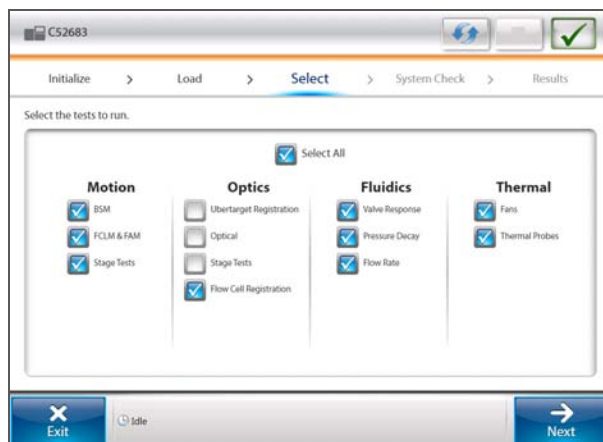
- **Custom** (Personalizzato)
  - **High** (Elevato): ricette personalizzate usate con un High Output Kit.
  - **Mid** (Medio): ricette personalizzate usate con un Mid Output Kit.
- **High** (Elevato): ricette originali usate con un High Output Kit.
- **Mid** (Medio): ricette originali usate con un Mid Output Kit.
- **Wash** (Lavaggio): contiene la ricetta per il lavaggio manuale.

Verifica del sistema

Una verifica del sistema non è necessaria per il normale funzionamento o per la manutenzione dello strumento. Tuttavia, un rappresentante dell'Assistenza tecnica Illumina potrebbe richiedere di eseguire una verifica del sistema per la risoluzione dei problemi.

NOTA
Se deve essere eseguito un lavaggio dello strumento, eseguire il lavaggio prima di avviare la verifica del sistema.

L'avvio di una verifica del sistema chiude il software di controllo e lancia NextSeq Service Software (NSS). Il software di servizio viene lanciato e si apre alla schermata Load (Carica), che viene configurata per usare l'opzione avanzata di caricamento.

Figura 27 Verifiche del sistema disponibili

Le caselle di controllo inattive sulla schermata Select (Selezione) indicano i test che richiedono l'assistenza da parte di un rappresentante dell'assistenza Illumina.

Esecuzione di una verifica del sistema

1. Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Check** (Verifica sistema). Quando richiesto di chiudere il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì).
2. Caricare i materiali di consumo nel modo seguente:
   a. Se una cella a flusso usata non è già sullo strumento, caricare una cella a flusso usata.
   b. Svuotare il contenitore dei reagenti usati e rimetterlo sullo strumento.
   c. Caricare la cartuccia dei tamponi di lavaggio contenente 120 ml di acqua da laboratorio nel serbatoio centrale.
   d. Caricare la cartuccia dei reagenti di lavaggio. Assicurarsi che la cartuccia dei reagenti di lavaggio sia vuota e pulita.
3. Selezionare **Load** (Carica). Il software sposta in posizione la cella a flusso e la cartuccia dei reagenti di lavaggio. Selezionare **Next** (Avanti).
4. Selezionare **Next** (Avanti). Viene avviata la verifica del sistema.
5. [Opzionale] Al termine della verifica del sistema, selezionare **View** (Visualizza) accanto al nome della verifica per visualizzare i valori associati a ciascuna verifica.

6 Selezionare **Next** (Avanti). Si apre il report della verifica del sistema.

7 Selezionare **Save** (Salva) per salvare il report in formato compresso. Andare alla posizione di rete in cui salvare il file.

8 Una volta terminato, selezionare **Exit** (Esci).

9 Quando richiesto di chiudere il software di controllo e di riavviare il software di controllo, selezionare **Yes** (Sì). Il software di controllo si riavvia automaticamente.

Verifiche del movimento

Verifica del sistema	Descrizione
BSM	Verifica il guadagno e la resistenza del meccanismo di prelievo dal flacone (Bottle Straw Mechanism - BSM) per confermare che il modulo funziona correttamente.
FCLM & FAM	Verifica il guadagno e la resistenza del meccanismo di caricamento della cella a flusso (Flow Cell Load Mechanism - FCLM) e del modulo di automazione della fluidica (Fluid Automation Module - FAM) per confermare che i moduli funzionano correttamente.
Stage Tests (Test del piano)	Verifica il limiti e le prestazioni di spostamento del piano XY e dei sei piani Z, uno per ciascuna videocamera.

Verifica del modulo ottica

Verifica del sistema	Descrizione
Flow Cell Registration (Registrazione cella a flusso)	Misura il tilt della cella a flusso sul piano ottico, verifica la funzionalità della videocamera, verifica il modulo di imaging e verifica che la registrazione della cella flusso sia nella posizione di imaging corretta.

Verifiche della fluidica

Verifica del sistema	Descrizione
Valve Response (Risposta valvola)	Verifica l'accuratezza dei movimenti della pompa e della valvola e verifica il range di movimento della siringa della pompa.
Pressure Decay (Riduzione pressione)	Verifica la portata delle perdite di un sistema di fluidica sigillato, che conferma che la cella a flusso è montata correttamente nella posizione di sequenziamento.
Flow Rate (Portata)	Verifica la funzionalità dei sensori delle bolle d'aria, che sono usati per rilevare la presenza di aria nelle linee dei reagenti. Misura le portate per verificare la presenza di occlusioni o perdite.

Verifiche termiche

Verifica del sistema	Descrizione
Fans (Ventole)	Verifica la velocità del sistema delle ventole in impulsi per minuto (PPM) per confermare il funzionamento delle ventole. Le ventole che non funzionano forniscono un valore negativo.
Thermal Probes (Sonde termiche)	Verifica la temperatura media di ciascun sensore termico. I sensori termici che non funzionano forniscono un valore negativo.

Messaggio di errore RAID

Il computer di NextSeq è dotato di due dischi rigidi. Se un disco rigido inizia a non funzionare, il sistema genera un messaggio di errore RAID e suggerisce di contattare l'Assistenza tecnica Illumina. Di solito, è richiesta la sostituzione del disco rigido.

È possibile proseguire con le fasi di impostazione della corsa e di funzionamento normale. Lo scopo del messaggio è quello di programmare in anticipo un intervento di assistenza per evitare interruzioni durante il funzionamento normale dello strumento. Per proseguire, selezionare **Acknowledge** (Accetta) e quindi **Close** (Chiudi).

Real-Time Analysis (RTA)

Introduzione

Il software integrato Real-Time Analysis (RTA) esegue l'analisi dei dati in tempo reale integrata sullo strumento durante la corsa di sequenziamento, comprese l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi, accelerando di conseguenza i tempi di analisi a valle. NextSeq usa una nuova implementazione del software Real-Time Analysis (RTA) chiamata RTA v2, che include differenze importanti nell'architettura e nelle caratteristiche.

RTA v2 introduce le differenze seguenti:

- Tutti i processi sono eseguiti in memoria per massimizzare la velocità di elaborazione.
- I file di configurazione, i formati file di output e il flusso di lavoro di elaborazione differiscono dalle implementazioni precedenti di RTA.
- Le impostazioni del file di configurazione usate con le implementazioni precedenti di RTA non sono compatibili con RTA v2.
- Se l'elaborazione viene arrestata, RTA v2 non continua o non riprende l'elaborazione. Non è possibile riavviare il software durante una corsa di sequenziamento.

Descrizione generale di RTA v2

RTA v2 viene eseguito sul computer dello strumento ed esegue l'analisi durante la corsa. RTA v2 estrae le intensità dalle immagini, esegue l'identificazione delle basi e assegna punteggi qualitativi all'identificazione delle basi.

A differenza delle versioni precedenti di RTA, RTA v2 e NextSeq Control Software (NCS) comunicano tramite un'interfaccia HTTP sul Web e condividono file di memoria. RTA v2 archivia in memoria tutte le informazioni dell'elaborazione per renderla più veloce possibile. Poiché l'elaborazione avviene in memoria, ***RTA v2 non può essere riavviato dopo l'interruzione di una corsa***.

Input per RTA v2

RTA v2 richiede i seguenti input per l'elaborazione:

- Le immagini delle tile contenute nella memoria locale del sistema.
- RunInfo.xml, che viene generato automaticamente all'inizio della corsa e fornisce il nome della corsa, il numero di cicli, se una lettura è indicizzata e il numero di tile sulla cella a flusso.
- RTA.exe.config, che è un file di configurazione software in formato XML.

RTA v2 riceve i comandi dal software di controllo sulla posizione del file RunInfo.xml e se è stata specificata una cartella di output opzionale.

File di output di RTA v2

Le immagini per ciascun canale sono passate in memoria come tile. Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come il campo visivo della videocamera. In base a queste immagini, il software produce output sotto forma di un set di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate e di file filtro. Tutti gli altri file sono file di output di supporto.

Tipo di file	Descrizione
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata viene inclusa in un file aggregato di identificazione delle basi (*.bcl) per ciascuna corsia e per ciascuna ciclo. Il file aggregato dell'identificazione delle basi contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo associato per ciascun cluster in quella corsia.
File filtro	Ciascuna tile produce informazioni sul filtro che vengono aggregate in un file filtro (*.filter) per ciascuna corsia. I file filtro specificano se un cluster attraversa i filtri.
File posizione cluster	I file posizione cluster (*.locs) contengono le coordinate X, Y per ciascun cluster in una tile. Un file posizione cluster viene generato per ciascuna corsia durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.
File indice identificazione delle basi	Un file indice identificazione delle basi (*.bci) viene generato per ciascuna corsia per preservare le informazioni originali della tile. Il file indice contiene una coppia di valori per ciascuna tile, che sono il numero di tile e il numero di cluster per quella tile.

I file di output sono usati per l'analisi a valle in BaseSpace. In alternativa, usare il software di conversione bcl2fastq per la conversione FASTQ e soluzioni di analisi di terze parti. I file

NextSeq richiedono bcl2fastq v2.0 o versione successiva. Per la versione più recente di bcl2fastq, visitare la pagina di download di NextSeq sul sito Web Illumina.

RTA v2 fornisce metriche in tempo reale sulla qualità della corsa archiviate come file InterOp. I file InterOp sono file di output binari che contengono tile, ciclo e metriche a livello di lettura e sono richiesti per visualizzare le metriche in tempo reale utilizzando Sequencing Analysis Viewer (SAV). Per la versione più recente del software SAV, visitare la la pagina di download di SAV sul sito Web Illumina.

Cluster che attraversano il filtro

Durante la corsa, RTA v2 filtra i dati non elaborati e rimuove le letture che non corrispondono alla soglia per la qualità dei dati. I cluster sovrapposti o di qualità bassa vengono rimossi.

Per l'analisi a due canali, RTA v2 utilizza un sistema basato sulla popolazione per determinare il valore chastity di una identificazione delle basi. I cluster attraversano il filtro (PF) quando non più di una identificazione delle basi nei primi 25 cicli hanno un valore chastity di < 0,63. I cluster che non attraversano il filtro non rappresentano un'identificazione delle basi.

Gestione degli errori di RTA v2

RTA v2 crea file di registro e li scrive nella cartella RTALogs. Gli errori vengono registrati in un file di errori in formato file *.tsv.

I file di registro e i file di errori seguenti sono trasferiti alla destinazione di output finale al termine dell'elaborazione:

- *GlobalLog*.tsv riassume importanti eventi della corsa.
- *LaneNLog*.tsv elenca gli eventi di elaborazione per ciascuna corsia.
- *Error*.tsv elenca gli errori che si sono verificati durante una corsa.
- *WarningLog*.tsv elenca gli avvertimenti che si sono verificati durante una corsa.

Flusso di lavoro di Real-Time Analysis

Il flusso di lavoro di Real-Time Analysis include le fasi seguenti:

- **Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster**: definisce le posizioni dei cluster.
- **Registrazione ed estrazione dell'intensità**: allinea le posizioni dei cluster e determina i valori di intensità.
- **Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing)**: corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing).
- **Identificazione delle basi**: determina una identificazione delle basi per ciascun cluster.
- **Punteggio qualitativo**: assegna un punteggio qualitativo per ciascuna identificazione delle basi.

Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

La prima fase nel flusso di lavoro RTA è la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, che definisce la posizione di ciascun cluster in una tile usando le coordinate X e Y.

La generazione della griglia per l'identificazione dei cluster richiede i dati dell'immagine ottenuti dai primi cinque cicli della corsa. Dopo che l'ultimo ciclo della griglia per una tile è stato sottoposto a imaging, viene generata la griglia.

NOTA
Per rilevare un cluster durante la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, deve essere presente una base che non sia G nei primi **cinque** cicli. Per qualsiasi sequenza indicizzata, RTA v2 richiede almeno una base che non sia G nei primi **due** cicli.

La griglia è usata come un riferimento per la fase successiva di registrazione ed estrazione dell'intensità. Le posizioni dei cluster per l'intera cella a flusso sono scritti nei file di posizione dei cluster (*.locs), uno per ciascuna corsia.

Registrazione ed estrazione dell'intensità

La registrazione e l'estrazione dell'intensità vengono avviate dopo la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.

- La registrazione allinea le immagini prodotte su ogni ciclo successivo di immagini rispetto alla griglia.
- L'estrazione dell'intensità determina un valore di intensità per ciascun cluster nella griglia per una data immagine.

Se la registrazione non riesce per una qualsiasi immagine in un ciclo, non viene generata alcuna identificazione delle basi per quella tile in quel ciclo. Usare il software Sequencing Analysis Viewer (SAV) per esaminare le immagini in miniatura e identificare le immagine la cui registrazione non è riuscita.

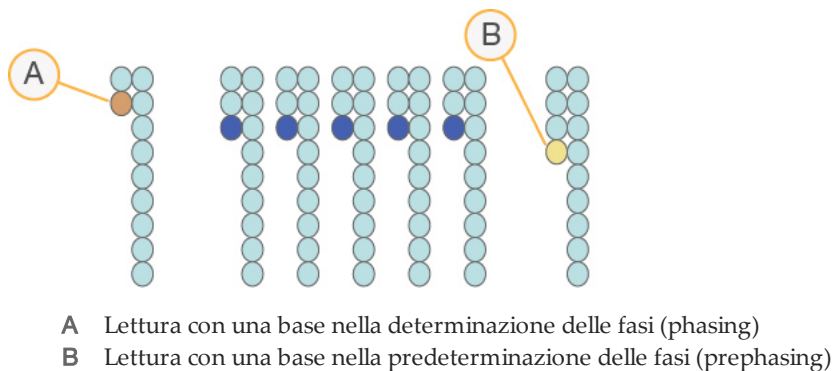
Correzione empirica della determinazione delle fasi (phasing)

Durante la reazione di sequenziamento, ciascun filamento di DNA in un cluster si estende di una base per ciclo. La determinazione delle fasi (phasing) e la predeterminazione delle fasi (prephasing) si verificano quando un filamento fuoriesce dalla fase con il ciclo di incorporazione attuale.

- La determinazione delle fasi (phasing) si verifica quando una base rimane indietro.

- La predeterminazione delle fasi (prephasing) si verifica quando una base salta in avanti.

Figura 28 Determinazione delle fasi (phasing) e predeterminazione delle fasi (prephasing)

A Lettura con una base nella determinazione delle fasi (phasing)
B Lettura con una base nella predeterminazione delle fasi (prephasing)

RTA v2 corregge gli effetti della determinazione delle fasi (phasing) e della predeterminazione delle fasi (prephasing) usando un algoritmo empirico per la correzione della determinazione delle fasi (phasing), che massimizza il valore chastity cumulativo dei dati a ogni ciclo per tutta la corsa. RTA v2 non applica correzioni alle letture indici.

Identificazione delle basi

L'identificazione delle basi determina una base (A, C, G o T) per ciascun cluster di una data tile a un ciclo specifico. NextSeq 500 usa il sequenziamento a due canali, che richiede solo due immagini per codificare i dati per quattro basi di DNA, un'immagine dal canale rosso e un'immagine dal canale verde.

Le intensità estratte da un'immagine confrontata con un'altra immagine fornisce quattro popolazioni distinte, ciascuna corrispondente a un nucleotide. Il processo di identificazione delle basi determina a quale popolazione appartiene ciascun cluster.

Figura 29 Intensità dei cluster in un grafico a dispersione

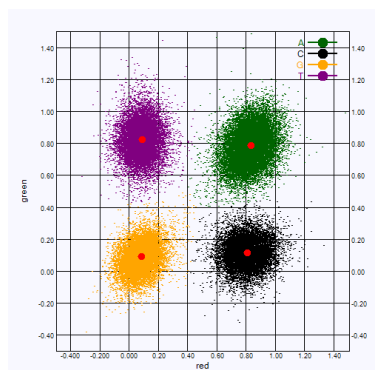



Tabella 1 Identificazione delle basi nel sequenziamento a due canali

Base	Canale rosso	Canale verde	Risultato
A	1 (on)	1 (on)	Cluster che mostrano intensità sia nel canale rosso che nel canale verde.
C	1 (on)	0 (off)	Cluster che mostrano intensità solo nel canale rosso.

Base	Canale rosso	Canale verde	Risultato
G	0 (off)	0 (off)	Cluster che non mostrano intensità a una posizione cluster nota.
T	0 (off)	1 (on)	Cluster che mostrano intensità solo nel canale verde.

Punteggio qualitativo

Un punteggio qualitativo (Q-score) è una previsione della probabilità di un'identificazione delle basi errata. Un punteggio qualitativo superiore implica che un'identificazione delle basi è più affidabile e più probabile che sia corretta.

Il punteggio qualitativo permette di comunicare velocemente la probabilità di piccoli errori. I punteggi qualitativi sono rappresentati come QXX, dove XX è il punteggio. La tabella seguente illustra la relazione fra il punteggio qualitativo e la probabilità di errore.

Punteggio qualitativo Q(X)	Probabilità di errore
Q40	0,0001 (1 su 10.000)
Q30	0,001 (1 su 1.000)
Q20	0,01 (1 su 100)
Q10	0,1 (1 su 10)

Il punteggio qualitativo calcola un set valori per ciascuna identificazione delle basi e quindi usa questi valori per individuare il punteggio qualitativo in una tabella qualitativa. Le tabelle qualitative sono create per fornire previsioni di qualità accurate ed ottimali per le corse generate da una specifica configurazione di una piattaforma di sequenziamento e versione della chimica.

Dopo la determinazione del punteggio qualitativo, i risultati sono registrati nei file per l'identificazione delle basi (*.bcl). Per maggiori informazioni, vedere *File di output per il sequenziamento* a pagina 66.

File di output per il sequenziamento

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File di identificazione delle basi	Ciascuna tile analizzata è inclusa in un file di identificazione delle basi, aggregata in un file per ciascuna corsia, per ciascun ciclo. Il file aggregato contiene l'identificazione delle basi e il punteggio qualitativo codificato per ciascun cluster per quella corsia. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. [Ciclo].bcl.bgzf, dove [ciclo] rappresenta il numero di ciclo in formato a quattro cifre. I file di identificazione delle basi sono compressi usando gzip.
File indice identificazione delle basi	Per ciascuna corsia, un file indice binario elenca le informazioni originali della tile in una coppia di valori per ciascuna tile, che sono numero di tile e numero di cluster per la tile. I file indice individuazione delle basi sono creati la prima volta che un file di identificazione delle basi viene creato per quella corsia. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[Corsia].bci
File posizione cluster	Per ciascuna tile, le coordinate XY per ciascun cluster sono aggregate in un file posizione cluster per ciascuna corsia. I file posizione cluster sono il risultato della generazione della griglia per l'identificazione dei cluster. Data\Intensities\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[corsia].locs
File filtro	I file filtro specificano se un cluster ha attraversato i filtri. Le informazioni sui filtri sono aggregate in un file filtro per ciascun corsia e lettura. I file filtro sono generati al ciclo 26 usando 25 cicli di dati. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia. s_[corsia].filter
File InterOp	File report binari usati dal software Sequencing Analysis Viewer (SAV). I file InterOp sono aggiornati durante tutta la corsa. Cartella InterOp
File configurazione RTA	Creati all'inizio di una corsa, i file configurazione RTA elencano le impostazioni per la corsa. [Cartella della corsa - livello base], RTAConfiguration.xml
File informazioni corsa	Elenca il nome della corsa, il numero di cicli in ciascuna lettura, se la lettura è una lettura indicizzata e il numero di strisce e tile sulla cella a flusso. Il file informazioni corsa viene creato all'inizio della corsa. [Cartella della corsa - livello base], RunInfo.xml

Tipo di file	Descrizione, posizione e nome del file
File immagini in miniatura (thumbnail)	Un'immagine in miniatura per ciascun canale colore (rosso e verde) per le tile 1, 6 e 12 da tutte le videocamere, superficie superiore e inferiore a ogni ciclo durante l'imaging. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: i file sono archiviati in una cartella per ciascuna corsia e una sotto cartella per ciascun ciclo. s_[corsia]_[tile]_[canale].jpg: nel nome del file, la tile è rappresentata da un numero a cinque cifre che indica superficie, striscia, videocamera e tile. Per maggiori informazioni, vedere *Numerazione delle tile* a pagina 70 e *Assegnazione di un nome alle immagine in miniatura (thumbnail)* a pagina 70.

Tile della cella a flusso

Le tile sono piccole aree di imaging sulla cella a flusso definite come il campo visivo della videocamera. Il numero totale di tile dipende dal numero di corsie, strisce e superfici sottoposte a imaging sulla cella a flusso e da come le videocamere lavorano assieme per raccogliere le immagini.

- Le celle a flusso a output elevato dispongono di 864 tile.
- Le celle a flusso a output medio dispongono di 288 tile.

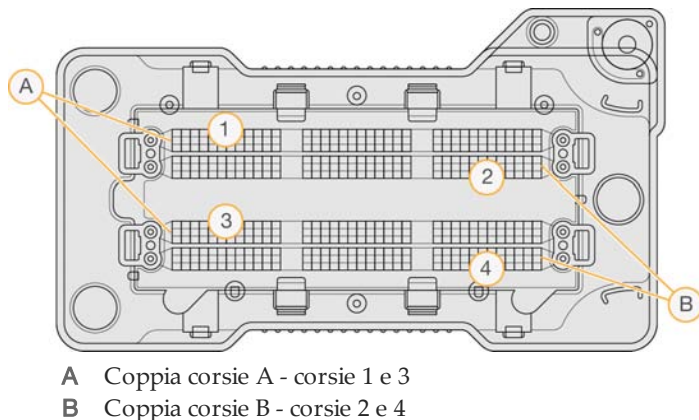
Tabella 2 Tile della cella a flusso

Componente della cella a flusso	Output elevato	Output medio	Descrizione
Corsie	4	4	Una corsia è un canale fisico con porte di ingresso e di uscita dedicate.
Superfici	2	2	La cella a flusso è sottoposta a imaging su due superfici, la superficie superiore e la superficie inferiore. La superficie superiore di una tile viene sottoposta a imaging, quindi la superficie inferiore della stessa tile viene sottoposta a imaging prima di passare alla tile successiva.
Strisce per corsia	3	1	Una striscia è una colonna di tile in una corsia.
Segmenti della videocamera	3	3	Lo strumento usa sei videocamere per sottoporre a imaging la cella a flusso in tre segmenti per ciascuna corsia.
Tile per striscia per segmento della videocamera	12	12	Una tile è un'area sulla cella a flusso che la videocamera visualizza come un'immagine.
Tile totali sottoposte a imaging	864	288	Il numero totale di tile corrisponde a corsie × superfici × strisce × segmenti della videocamera × tile per striscia per segmento.

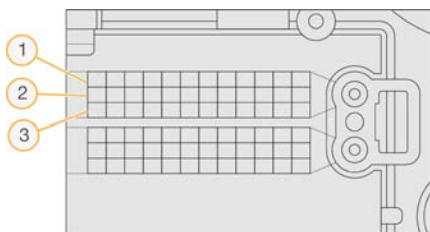
Numerazione delle corsie

Le corsie 1 e 3, chiamate coppia corsie A, sono sottoposte a imaging contemporaneamente. Le corsie 2 e 4, chiamate coppia corsie B, sono sottoposte a imaging al completamento dell'imaging della coppia corsie A.

Figura 30 Numerazione delle corsie

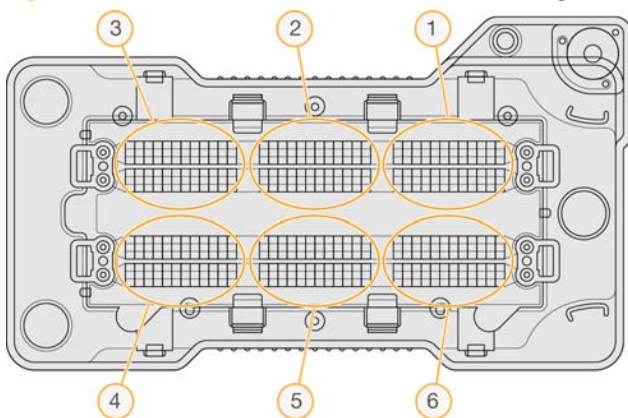
A Coppia corsie A - corsie 1 e 3
B Coppia corsie B - corsie 2 e 4

Numerazione delle strisce

Ciascuna corsia viene sottoposta a imaging in tre strisce. Le strisce sono numerate 1-3 per le celle a flusso a output elevato.

Figura 31 Numerazione delle strisce

Numerazione delle videocamere

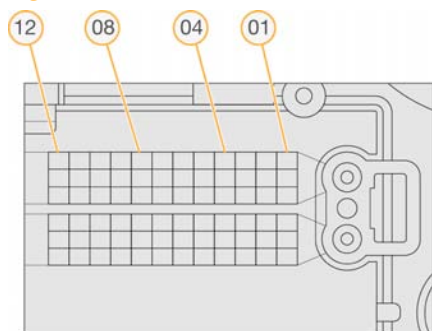
NextSeq 500 utilizza sei videocamere per sottoporre a imaging la cella a flusso.

Le videocamere sono numerate 1-6. Le videocamere 1-3 sottopongono a imaging la corsia 1. Le videocamere 4-6 sottopongono a imaging la corsia 3. Una volta sottoposte a imaging le corsie 1 e 3, il modulo di imaging si sposta sull'asse X per sottoporre a imaging le corsie 2 e 4.

Figura 32 Numerazione delle videocamere e dei segmenti

Mostrata una cella a flusso High output (Output elevato)

Numerazione delle tile

In ciascuna striscia sono presenti 12 tile per ciascun segmento della videocamera. Le tile sono numerate 01-12 (numero a due cifre) indipendentemente dal numero della striscia o del segmento della videocamera.

Figura 33 Numerazione delle tile

Il numero completo della tile include cinque cifre che rappresentano la posizione, come indicato qui di seguito:

- **Superficie**: 1 rappresenta la superficie superiore; 2 rappresenta la superficie inferiore
- **Striscia**: 1, 2 o 3
- **Videocamera**: 1, 2, 3, 4, 5 o 6
- **Tile**: 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 o 12

Esempio: il numero di tile 12508 indica superficie superiore, striscia numero 2, videocamera numero 5 e tile numero 8.

Il numero di tile a cinque cifre completo è usato nel nome del file delle immagini in miniatura e nei file di determinazione delle fasi (phasing). Per ulteriori informazioni, vedere *File di output per il sequenziamento* a pagina 66.

Assegnazione di un nome alle immagine in miniatura (thumbnail)

Un'immagine in miniatura per ciascun canale colore (rosso e verde) per le tile 1, 6 e 12 è generata da tutte le videocamere, superficie superiore e inferiore a ogni ciclo durante l'imaging. I file delle immagini in miniatura sono generati in formato file JPG.

A ciascuna immagine viene assegnato un nome con il numero di tile come indicato dalla convenzione seguente, che inizia sempre per **s_**:

- **Corsia**: 1, 2, 3 o 4
- **Tile**: numero della tile a cinque cifre, che indica superficie, striscia, videocamera e tile.
- **Canale**: rosso o verde

Esempio: s_3_12512_green.jpg indica corsia numero 3, superficie superiore, striscia numero 2, videocamera numero 5, tile numero 12 e canale verde.

Struttura della cartella di output del sequenziamento

- **Data**
  - **Intensities**
    - **BaseCalls**
      - **L001**: i file di identificazione delle basi per la corsia 1, aggregate in un file per ciclo.
      - **L002**: i file di identificazione delle basi per la corsia 2, aggregate in un file per ciclo.
      - **L003**: i file di identificazione delle basi per la corsia 3, aggregate in un file per ciclo.
      - **L004**: i file di identificazione delle basi per la corsia 4, aggregate in un file per ciclo.
    - **L001**: un file *.locs aggregato per la corsia 1.
    - **L002**: un file *.locs aggregato per la corsia 2.
    - **L003**: un file *.locs aggregato per la corsia 3.
    - **L004**: un file *.locs aggregato per la corsia 4.
- **Images**
  - **Focus**
    - **L001**: le immagini di messa a fuoco per la corsia 1.
    - **L002**: le immagini di messa a fuoco per la corsia 2.
    - **L003**: le immagini di messa a fuoco per la corsia 3.
    - **L004**: le immagini di messa a fuoco per la corsia 4.
- **InterOp**: i file binari usati da Sequencing Analysis Viewer (SAV).
- **Logs**: i file di registro che descrivono le fasi operative.
- **Recipe**: il file della ricetta specifico per la corsa denominato con l'ID della cartuccia di reagenti.
- **RTALogs**: i file di registro che descrivono le fasi dell'analisi.
- **Thumbnail_Images**: le immagini in miniatura per le tile 1, 6 e 12 in ciascuna striscia a ciascun ciclo.
- RTAComplete.xml
- RTAConfiguration.xml
- RunInfo.xml
- RunNotes.xml
- RunParameters.xml

Indice

T

V

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 3 Dati di contatto generali Illumina

Sito Web	www.illumina.com
Email	techsupport@illumina.com

Tabella 4 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Australia	1.800.775.688	Norvegia	800.16836
Austria	0800.296575	Nuova Zelanda	0800.451.650
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.0223859
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

Schede di sicurezza (SDS)

Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito web di Illumina. Andare al sito support.illumina.com e selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).